

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 11 月 4 日 (04.11.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/093912 A1(51) 国際特許分類: A61K 45/00,  
31/55, 39/395, 48/00, A61P 7/00, 11/00, 29/00 // C07D  
403/06, 401/14, 417/14, 471/04[JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目 6 番  
1 号 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005930

(22) 国際出願日: 2004 年 4 月 23 日 (23.04.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2003-118432 2003 年 4 月 23 日 (23.04.2003) JP  
特願2004-052191 2004 年 2 月 26 日 (26.02.2004) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和発酵  
工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)

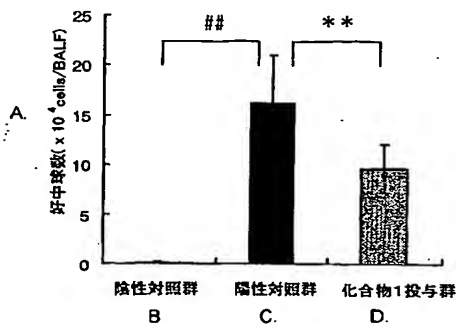
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐木 真由美  
(SAKI, Mayumi). 野中 裕美 (NONAKA, Hiromi). 宮地  
宏昌 (MIYAJI, Hiromasa). 高橋 知佐 (TAKAHASHI,  
Chisa). 真部 治彦 (MANABE, Haruhiko). 檜浦 奈緒  
子 (HIURA, Naoko). 三木 一郎 (MIKI, Ichiro). 阿  
部 譲 (ABE, Yuzuru). 佐々木 克敏 (SASAKI, Katsu-  
toshi). 小畑 長英 (KOBATAKE, Choei). 市川 俊司  
(ICHIKAWA, Shunji). 後藤 晃久 (GOTO, Akihisa). 須  
田 敏郎 (SUDA, Toshio).(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,

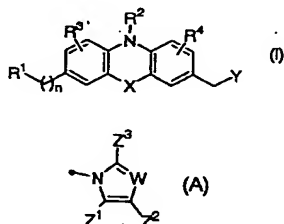
[続葉有]

(54) Title: PREVENTIVE AND/OR THERAPEUTIC AGENT FOR NEUTROPHIL INFLAMMATION DISEASE

(54) 発明の名称: 好中球性炎症疾患の予防および/または治療剤



A...NO. OF NEUTROPHILS ( $\times 10^4$  Cells/BALF)  
B...NEGATIVE CONTROL GROUP  
C...POSITIVE CONTROL GROUP  
D...COMPOUND 1 ADMINISTRATION GROUP



(57) Abstract: A preventive and/or therapeutic agent for neutrophil inflammation disease, comprising as an active ingredient a substance capable of inhibiting the function relating to GPR4 signal transmission. In particular, a preventive and/or therapeutic agent for neutrophil inflammation disease, comprising a nitrogenous tricyclic compound of the formula (I): [wherein  $R^1$  is a substituted or unsubstituted heterocyclic group, etc.;  $R^2$  is hydrogen, a substituted or unsubstituted lower alkyl, etc.; each of  $R^3$  and  $R^4$  independently is hydrogen, a lower alkyl, etc.;  $n$  is 0 or 1;  $X$  is  $-(CH_2)_2$ , etc.; and  $Y$  is represented by the formula: (A) (wherein  $W$  is CH or a nitrogen atom; each of  $Z^1$  and  $Z^2$  independently is hydrogen, a substituted or unsubstituted lower alkyl, etc.; and  $Z^3$  is hydrogen, a substituted or unsubstituted lower alkyl, etc.)], or a quaternary ammonium salt of the same or a pharmacologically acceptable salt thereof.

[続葉有]



DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

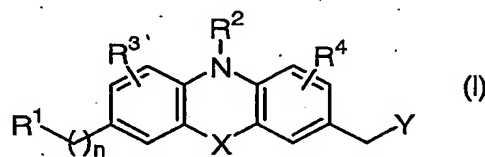
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

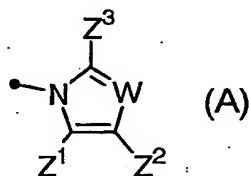
(57) 要約:

GPR4のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質を有効成分として含有する好中球性炎症疾患の予防および/または治療剤を提供する。

また、式 (I)



[式中、R¹は置換もしくは非置換の複素環基等を表し、R²は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル等を表し、R³およびR⁴は同一または異なって水素、低級アルキル等を表し、nは0または1を表し、Xは-(CH₂)₂-等を表し、Yは式 (A)



(式中、WはCHまたは窒素原子を表し、Z¹およびZ²は同一または異なって水素、置換もしくは非置換の低級アルキル等を表し、Z³は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル等を表す) を表す] で表される含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩を含有する好中球性炎症疾患の予防および/または治療剤を提供する。

## 明 細 書

## 好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤

技術分野

本発明は、GPR4のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質を有効成分として含有する好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤に関する。また本発明は、含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤に関する。

背景技術

好中球は、炎症部位に浸潤し、スーパーオキシドアニオン、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$ 等を産生し、炎症を促進する作用を有している。慢性閉塞性肺疾患(COPD)、関節炎、敗血症、虚血再灌流障害、肺繊維症等種々の炎症性疾患で好中球の関与が示唆されている(ラボラトリー・インベスティゲーション(Laboratory Investigation)、2000年、80巻、p.617-653)。また、好中球の浸潤は、好中球遊走因子により誘導される。したがって、好中球遊走因子の産生または好中球の浸潤を抑制することが、これらの炎症性疾患の治療に重要であると考えられている。

好中球が関与する炎症疾患としては、COPD、関節炎、敗血症、虚血再灌流障害および肺繊維症以外にも、例えば、肺気腫、慢性気管支炎、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、急性肺損傷(ALI)、鼻炎、サルコイドーシス、間質性肺炎、関節リウマチ、ベーチェット病、シェーングレン症候群、強皮症、乾癬、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、蕁麻疹、血管炎、紅斑、結膜炎、好酸球増多症、ブドウ膜炎、円形脱毛症、湿疹、扁平苔癬、水疱症、天疱瘡、直腸炎、好酸球性胃腸炎、肥満細胞症、クローン病、潰瘍性大腸炎、食物アレルギー、多発性硬化症、アテローム性動脈硬化症、後天性免疫不全症候群(AIDS)、全身性エリテマトーデス、橋本病、ネフローゼ症候群、重症筋無力症、I型糖尿病、好酸球性筋膜炎、高IgB血漿、ライ病、紫斑病、移植片拒絶、扁平上皮がん、肺がん、嚢胞性繊維症、脳卒中、心臓および末梢肢における再灌流障害、痛風、過敏性腸症候群、炎症性肺疾患、炎症性大腸疾患、肝炎、脾炎、アレルギー、潰瘍、肺繊維症以外の繊維症、偏頭痛、心疾患、循環器疾

患、炎症性皮膚疾患、放射線による炎症、髄膜炎等の炎症、虚血（心筋梗塞、脳虚血、骨格筋虚血、腸虚血等）、脳障害、内毒症、石綿沈着症等が知られている（WO00/62766、US2003/191088、EP1262176、US6627621）。

GPR4は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質（以下、GPCRと略す）であり、脂質であるスフィンゴシルホスホリルコリン（SPC）やリゾホスファチジルコリン（LPC）と結合し、シグナルを伝達することおよびGPR4発現細胞の遊走を誘導することが報告されている〔ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J. Biol. Chem.）、276巻、p.41325-41335（2001年）〕。

GPCRとしては、細胞内で過剰に発現すると、リガンドが存在しなくてもシグナルを流す、構成活性型GPCRと呼ばれるGPCRも知られている。リガンド非存在時に流れるシグナルは構成的活性と呼ばれる。構成活性型GPCRには、天然に存在するものと、アミノ酸の置換、欠失等の変異を導入することにより造成された変異GPCR〔モレキュラー・ファルマコロジー（Mol. Pharmacol.）、57巻、890頁（2000年）、WO98/46995〕がある。GPCRの構成的活性を抑制するアンタゴニストはインバーサアゴニストと呼ばれる。

また、ブレチン・デ・ラ・ソシエテ・シミック（Bulletin de la Societe Chimique）、185頁（1981年）およびヨーロッパ・ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー（Eur. J. Med. Chem.）、12巻、219頁（1977年）に、後述の式（I）において $R^1$ がモルホリノを表し、 $R^2$ 、 $R^3$ および $R^4$ が水素を表し、Yに相当する置換基がモルホリノであり、nが1を表し、Xが $-(CH_2)_2-$ を表す化合物が開示されている。

#### 発明の開示

本発明の目的は、GPR4のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質を有効成分として含有する好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤、含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤、後述の式（II）で表される化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤等を提供することである。

本発明は、以下の（1）～（13）に関する。



(1) 配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質を有効成分として含有する好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤。

(2) 好中球性炎症疾患が、慢性閉塞性肺疾患(COPD)である第(1)項記載の好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤。

(3) 以下の1)～4)

1) 配列番号12記載の塩基配列から選ばれる連続した15～60塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、

2) 配列番号14記載の塩基配列から選ばれる連続した15～60塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、

3) 配列番号18記載の塩基配列から選ばれる連続した15～60塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、

4) 配列番号12、14および18から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列を有するDNAとズトリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する15～60塩基からなるオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、

のいずれか一つを有効成分として含有する好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤。

(4) 以下の1)～4)

1) 配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体、

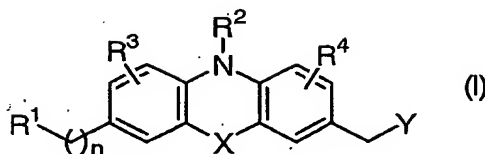
2) 配列番号13記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体、

3) 配列番号17記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体、

4) 配列番号11、13および17から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列を有し、かつ配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を有する蛋白質を認識する抗体、

のいずれか一つを有効成分として含有する好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤。

(5) 式 (I)



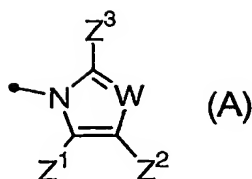
[式中、 $R^1$ は置換もしくは非置換の複素環基、 $-NR^5R^6$  (式中、 $R^5$ および $R^6$ は同一または異なって水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表すか、 $R^5$ および $R^6$ が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する)、 $-OR^7$  (式中、 $R^7$ は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表す)、 $-SR^{7a}$  (式中、 $R^{7a}$ は前記 $R^7$ と同義である)、 $-CONR^{5a}R^{6a}$  (式中、 $R^{5a}$ および $R^{6a}$ はそれぞれ前記 $R^5$ および前記 $R^6$ と同義である)、 $-CO_2R^{7b}$  (式中、 $R^{7b}$ は前記 $R^7$ と同義である)、ホルミルまたはシアノを表し、 $R^2$ は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表し、

$R^3$ および $R^4$ は同一または異なって水素、低級アルキル、またはハロゲンを表し、

$n$ は0または1を表し、

$X$ は $-(CH_2)_2-$ または $-CH=CH-$ を表し、

Yは式 (A)



(式中、WはCHまたは窒素原子を表し、

Z<sup>1</sup>およびZ<sup>2</sup>は同一または異なって水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表すか、Z<sup>1</sup>およびZ<sup>2</sup>がそれぞれが隣接する2つの炭素原子と一緒になって置換もしくは非置換の芳香環を形成するか、またはZ<sup>1</sup>およびZ<sup>2</sup>がそれぞれが隣接する2つの炭素原子と一緒になって置換もしくは非置換の複素環を形成し、

Z<sup>3</sup>は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換の複素環基、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表す)を表す]で表される含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理的に許容される塩を有効成分として含有する好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤。

(6) R<sup>1</sup>が-NR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>であり、R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>が隣接する窒素原子と一緒になって置換もしくは非置換の複素環基を形成する第(5)項記載の好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤。

(7) R<sup>2</sup>が水素である第(5)項または第(6)項に記載の好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤。

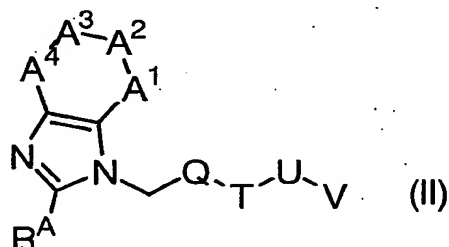
(8) R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>が水素である第(5)項～第(7)項のいずれかに記載の好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤。

(9)  $Z^1$ および $Z^2$ がそれぞれが隣接する2つの炭素原子と一緒になって置換もしくは非置換の複素環を形成する第(5)項～第(8)項のいずれかに記載の好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤。

(10) 第(5)項～第(9)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩の有効量を投与することを特徴とする、好中球性炎症疾患の予防および／または治療方法。

(11) 好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤の製造のための第(5)項～第(9)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩の使用。

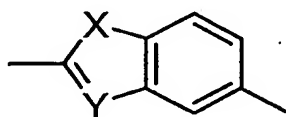
(12) 式(II)



{式中、 $R^A$ は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアロイル、置換もしくは非置換の複素環基、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表し、

$A^1-A^2-A^3-A^4$ は $N=CR^C-CR^D=CR^E$  (式中、 $R^C$ 、 $R^D$ および $R^E$ は同一または異なって、それぞれ前記 $R^A$ と同義である)、 $CR^B=CR^C-CR^D=CR^E$  (式中、 $R^B$ 、 $R^C$ 、 $R^D$ および $R^E$ は同一または異なって、それぞれ前記 $R^A$ と同義である)、 $N=CR^C-N=CR^E$  (式中、 $R^C$ および $R^E$ は同一または異なって、それぞれ前記 $R^A$ と同義である) または  $CR^B=CR^C-N=CR^E$  (式中、 $R^B$ 、 $R^C$ および $R^E$ は同一または異なって、それぞれ前記 $R^A$ と同義である) を表し、

Qは、置換もしくは非置換のフェニレン（但し、置換フェニレンにおける置換基はシアノ、ニトロ、 $\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{R}^Q$ （式中、 $\text{R}^Q$ は前記 $\text{R}^A$ と同義である）および低級アルコキシカルボニルではない）、置換もしくは非置換のナフチレン（但し、置換ナフチレンにおける置換基はシアノ、ニトロ、 $\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{R}^Q$ （式中、 $\text{R}^Q$ は前記 $\text{R}^A$ と同義である）および低級アルコキシカルボニルではない）、炭素数2～6で窒素、酸素および硫黄から任意に選ばれる原子数1～4である置換もしくは非置換の不飽和もしくは部分的に不飽和の5～7員の単環式複素環から2つの水素原子が除かれた基（但し、炭素数2～6で窒素、酸素および硫黄から任意に選ばれる原子数1～4である置換の不飽和もしくは部分的に不飽和の5～7員の単環式複素環における置換基はシアノ、ニトロ、 $\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{R}^Q$ （式中、 $\text{R}^Q$ は前記 $\text{R}^A$ と同義である）および低級アルコキシカルボニルではない）、炭素数4～10で窒素、酸素および硫黄から任意に選ばれる原子数1～4である置換もしくは非置換の不飽和もしくは部分的に不飽和の環構成原子数が8～11の二環式複素環から2つの水素原子が除かれた基（但し、炭素数4～10で窒素、酸素および硫黄から任意に選ばれる原子数1～4である不飽和もしくは部分的に不飽和の環構成原子数が8～11の二環式複素環から2つの水素原子が除かれた基が、



{式中、

Xは $\text{NR}^X$ 〔式中、 $\text{R}^X$ は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換のシクロアルキルカルボニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアロイルまたは置換もしくは非置換の芳香族複素環基（テトラゾリルを除く）を表す〕、酸素原子または硫黄原子を表し、

Yは窒素原子または $\text{CR}^Y$ 〔式中、 $\text{R}^Y$ は水素、低級アルキル、以下の置換基群A

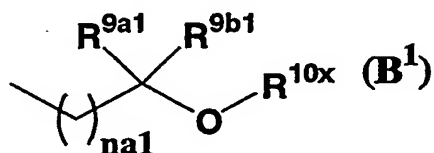
から選ばれる同一のまたは異なる1~3の置換基で置換された低級アルキル  
 [置換基群A: ハロゲン、ヒドロキシ、ホルミル、トリフルオロメチル、ビ  
 ニル、スチリル、フェニルエチニル、アロイル、置換もしくは非置換の脂環  
 式複素環基および置換もしくは非置換の芳香族複素環基(テトラゾリルを除  
 く)]、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級  
 アルカノイル、置換もしくは非置換のシクロアルキルカルボニル、置換もし  
 くは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非  
 置換のアロイル、置換もしくは非置換の芳香族複素環基(テトラゾリルを除  
 く)、式(A<sup>1</sup>)



{式中、Q---VはCR<sup>7x</sup>=CR<sup>8x</sup>[式中、R<sup>7x</sup>およびR<sup>8x</sup>は同一または異なって、水素、  
 低級アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もし  
 くは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置  
 換もしくは非置換のシクロアルキルカルボニル、置換もしくは非置換のアリ  
 ール、置換もしくは非置換のアロイルまたは置換もしくは非置換の芳香族複  
 素環基(テトラゾリルを除く)を表す] またはC≡Cを表し、

R<sup>6</sup>は水素、低級アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換の低級アルキル、  
 置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルカノ  
 イル、置換もしくは非置換のシクロアルキルカルボニル、置換もしくは非置  
 換のアリール、置換もしくは非置換のアロイルまたは置換もしくは非置換の  
 芳香族複素環基(テトラゾリルを除く)を表す}

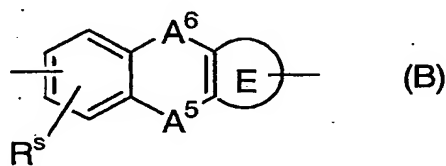
または式(B<sup>1</sup>)



[式中、 $na1$ は0～3の整数を表し、 $R^{9a1}$ および $R^{9b1}$ は、同一または異なって水素、ハロゲン、低級アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換のシクロアルキルカルボニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアロイルまたは置換もしくは非置換の芳香族複素環基（テトラゾリルを除く）を表すか、または $R^{9a1}$ と $R^{9b1}$ が隣接する炭素原子と一緒になって飽和脂肪族環を形成し、

$R^{10a}$ は置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換のシクロアルキルカルボニル、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアロイルまたは置換もしくは非置換の芳香族複素環基（テトラゾリルを除く）を表す]を表す}を表すときは、炭素数4～10で窒素、酸素および硫黄から任意に選ばれる原子数1～4である置換の不飽和もしくは部分的に不飽和の環構成原子数が8～11の二環式複素環から2つの水素原子が除かれた基における置換基はニトロ、シアノおよび低級アルコキシカルボニルではない>

式 (B)



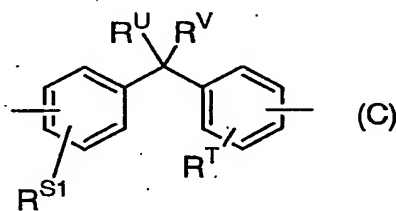
[式中、 $A^5$ は $-CR^P R^Q-$ （式中、 $R^P$ および $R^Q$ は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換の複素環基、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル、またはモノもしくはジ低級アルキルアミノカルボニルを表す）、 $-CR^P R^Q-CR^R R^J-$ （式中、 $R^P$ および $R^Q$ はそれぞれ前記と同義であり、 $R^R$ および $R^J$ はそれぞれ前記 $R^P$ および $R^Q$ と同義である）、 $-N=CR^R-$ （式中、 $R^R$ は前記と同義である）、 $-CR^P=N-$ （式

中、 $R^F$ は前記と同義である)、 $-CR^F=CR^H-$ (式中、 $R^F$ および $R^H$ はそれぞれ前記と同義である)、 $-OCR^H R^J-$ (式中、 $R^H$ および $R^J$ はそれぞれ前記と同義である)、 $-CR^F R^Q-$ (式中、 $R^F$ および $R^Q$ はそれぞれ前記と同義である)、 $-SO_{n1} CR^H R^J-$ (式中、 $R^H$ および $R^J$ はそれぞれ前記と同義であり、 $n1$ は0~2の整数を表す)、 $-CR^F R^Q SO_{n1}-$ (式中、 $R^F$ 、 $R^Q$ および $n1$ はそれぞれ前記と同義である)、 $-O-$ 、または $-SO_{n1}-$ (式中、 $n1$ は前記と同義である)を表し、

$A^6$ は $-CR^{Fa} R^{Ga}-$ (式中、 $R^{Fa}$ および $R^{Ga}$ はそれぞれ前記 $R^F$ および $R^G$ と同義である)、 $-C(=O)-$ または $-NR^R-$ (式中、 $R^R$ は前記 $R^A$ と同義である)を表し、

$R^S$ は、水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアロイル、置換もしくは非置換の複素環基、置換もしくは非置換の複素環アルキル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、低級アルコキシ、またはモノもしくはジ低級アルキルアミノを表し、

環Bはベンゼン環、または窒素、酸素および硫黄から任意に選ばれる元素を1個以上有する芳香族複素環を表す]、または式(C)



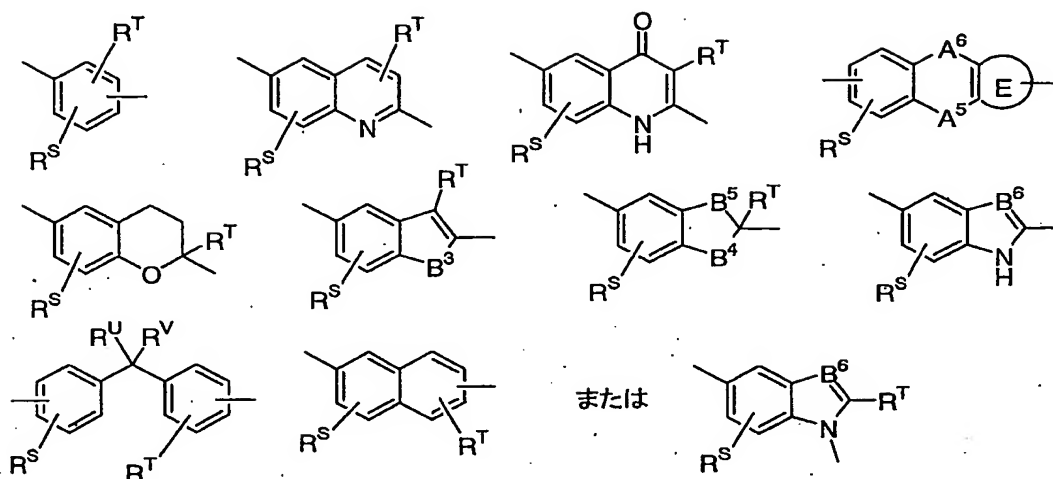
(式中、 $R^{S1}$ 、 $R^T$ 、 $R^U$ および $R^V$ は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアロイル、置換もしくは非置換の複素環基、置換もしくは非置換の複素環アルキル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミ



ノ、低級アルコキシ、またはモノもしくはジ低級アルキルアミノを表し、 $R^U$ および $R^V$ は同一または異なって、さらに低級アルコキシカルボニル、またはモノもしくはジ低級アルキルアミノカルボニルであつてもよい)を表し、 $T$ は単結合、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-NR^K-$  (式中、 $R^K$ は前記 $R^A$ と同義である)、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^K-$  (式中、 $R^K$ は前記と同義である)、 $-NR^KC(=O)-$  (式中、 $R^K$ は前記と同義である)、 $-OCH_2-$ 、 $-CH_2O-$ 、 $-SCH_2-$ 、 $-SOCH_2-$ 、 $-SO_2CH_2-$ 、 $-CH_2S-$ 、 $-CH_2SO-$ 、 $-CH_2SO_2-$ 、 $-NR^KCR^L R^M-$  (式中、 $R^K$ は前記と同義であり、 $R^L$ および $R^M$ は同一または異なって、それぞれ $R^A$ と同義である)、 $-NR^KSO_2-$  (式中、 $R^K$ は前記と同義である)、 $-SO_2NR^K-$  (式中、 $R^K$ は前記と同義である)、 $-CR^L R^M NR^K-$  (式中、 $R^K$ 、 $R^L$ および $R^M$ はそれぞれ前記と同義である)、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH=CH-$ 、 $-CH(OR^{KA})-$  (式中、 $R^{KA}$ は前記 $R^A$ と同義である)、 $-CH(OCOR^{KB})-$  (式中、 $R^{KB}$ は前記 $R^A$ と同義である)、または $-CH(NR^{KC}R^{KD})-$  (式中、 $R^{KC}$ および $R^{KD}$ は同一または異なって、それぞれ前記 $R^A$ と同義である)を表し、 $U$ は単結合、 $-(CH_2)_{m1}CR^M R^P-$  (式中、 $m1$ は0~2の整数を表し、 $R^M$ および $R^P$ は同一または異なって、それぞれ前記 $R^A$ と同義である)、または置換もしくは非置換のフェニレンを表し、 $V$ はカルボキシ、テトラゾール-5-イル、 $-CONH_2$ 、 $-CONHSO_2R^Q$  (式中、 $R^Q$ は前記 $R^A$ と同義である)、 $-SO_3R^Q$  (式中、 $R^Q$ は前記と同義である)、 $-SO_2NHR^Q$  (式中、 $R^Q$ は前記と同義である)、 $-SO_2NHCOR^Q$  (式中、 $R^Q$ は前記と同義である)、 $-SO_2NHCONR^R R^{RB}$  (式中、 $R^R$ および $R^{RB}$ は同一または異なって、それぞれ前記 $R^A$ と同義である)、 $-NHSO_2R^Q$  (式中、 $R^Q$ は前記と同義である)、 $-P(O)(OR^{RC})(OR^{RD})$  (式中、 $R^{RC}$ および $R^{RD}$ は同一または異なって、それぞれ前記 $R^A$ と同義である)、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニル、シアノ、またはニトロを表す}

で表される化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する好中球性炎症疾患の予防および/または治療剤。

(13) Qが下式



[式中、R<sup>s</sup>、R<sup>r</sup>、R<sup>v</sup>およびR<sup>v'</sup>は同一または異なって水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアロイル、置換もしくは非置換の複素環基、置換もしくは非置換の複素環アルキル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、低級アルコキシ、またはモノもしくはジ低級アルキルアミノを表し、

A<sup>5</sup>およびA<sup>6</sup>はそれぞれ前記と同義であり、

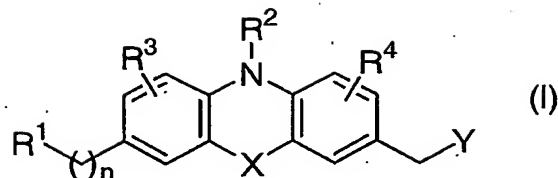
B<sup>3</sup>、B<sup>4</sup>およびB<sup>5</sup>は同一または異なって-O-または-S-を表し、

$B^6$ は $-CR^R-$ （式中、 $R^R$ は前記と同義である）または $-N-$ を表し、

環Bはベンゼン環、または窒素、酸素および硫黄から任意に選ばれる元素を1個以上有する芳香族複素環を表す]で表される第(12)項記載の好中球形炎症疾患の予防および／または治療剤。

さらに本発明は以下の（１４）～（４８）に関する。

(14) 式 (I)



(式中、 $n$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $X$ および $Y$ はそれぞれ前記と同義である)で表される含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理的に許容される塩。

(15)  $R^1$ が $-NR^5R^6$ であり、 $R^5$ および $R^6$ が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する第(14)項に記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理的に許容される塩。

(16)  $R^2$ が水素である第(14)項または第(15)項に記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理的に許容される塩。

(17)  $R^3$ および $R^4$ が水素である第(14)項～第(16)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理的に許容される塩。

(18)  $Z^1$ および $Z^2$ がそれぞれが隣接する2つの炭素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環を形成する第(14)項～第(17)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理的に許容される塩。

(19) 第(14)項～第(18)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理的に許容される塩を有効成分として含有する医薬。

(20) 第(14)項～第(18)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理的に許容される塩を有効成分として含有する配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能の抑制剤。

(21) 以下の工程1)～4)

1) ヒトを除く哺乳類動物にSPCまたはLPCを気道内投与することによりヒトを除く哺乳類動物における気管支肺胞に好中球浸潤を誘発する工程、  
2) 試験化合物存在下または非存在下でのSPCまたはLPCにより誘発されたヒトを除く哺乳類動物における気管支肺胞中の好中球浸潤を測定する工程、  
3) 試験化合物存在下と試験化合物非存在下でのSPCまたはLPCにより誘発されたヒトを除く哺乳類動物における気管支肺胞中の好中球浸潤を比較する工程、および

4) 試験化合物からSPCまたはLPCにより誘発された気管支肺胞中の好中球浸潤を減少させる物質を選択する工程、  
を含む好中球性炎症疾患治療剤のスクリーニング法。

(22) 配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質の有効量を投与することを特徴とする、好中球性炎症疾患の予防および／または治療方法。

(23) 第(3)項に記載の1)～4)のいずれか一つのオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体の有効量を投与することを特徴とする、好中球性炎症疾患の予防および／または治療方法。

(24) 第(4)項に記載の1)～4)のいずれか一つの抗体の有効量を投与することを特徴とする、好中球性炎症疾患の予防および／または治療方法。

(25) 好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤の製造のための、配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質の使用。

(26) 好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤の製造のための、第(3)項に記載の1)～4)のいずれか一つのオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体の使用。

(27) 好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤の製造のための、第(4)項に記載の1)～4)のいずれか一つの抗体の使用。

(28) 好中球性炎症疾患が、関節炎、敗血症および急性呼吸窮迫症候群(ARDS)から選ばれる好中球性炎症疾患である第(1)項記載の好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤。

(29) 好中球性炎症疾患が、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、関節炎、敗血症お

よび急性呼吸窮迫症候群(ARDS)から選ばれる好中球性炎症疾患である第

(3) 項記載の好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤。

(30) 好中球性炎症疾患が、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、関節炎、敗血症および急性呼吸窮迫症候群(ARDS)から選ばれる好中球性炎症疾患である第

(4) 項記載の好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤。

(31) 配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質の有効量を投与することを特徴とする、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、関節炎、敗血症および急性呼吸窮迫症候群(ARDS)から選ばれる好中球性炎症疾患の予防および／または治療方法。

(32) 第(3) 項に記載の 1) ~ 4) のいずれか一つのオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体の有効量を投与することを特徴とする、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、関節炎、敗血症および急性呼吸窮迫症候群(ARDS)から選ばれる好中球性炎症疾患の予防および／または治療方法。

(33) 第(4) 項に記載の 1) ~ 4) のいずれか一つの抗体の有効量を投与することを特徴とする、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、関節炎、敗血症および急性呼吸窮迫症候群(ARDS)から選ばれる好中球性炎症疾患の予防および／または治療方法。

(34) 慢性閉塞性肺疾患(COPD)、関節炎、敗血症および急性呼吸窮迫症候群(ARDS)から選ばれる好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤の製造のための、配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質の使用。

(35) 慢性閉塞性肺疾患(COPD)、関節炎、敗血症および急性呼吸窮迫症候群(ARDS)から選ばれる好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤の製造のための、第(3) 項記載に記載の 1) ~ 4) のいずれか一つのオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体の使用。

(36) 慢性閉塞性肺疾患(COPD)、関節炎、敗血症および急性呼吸窮迫症候群(ARDS)から選ばれる好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤の製造のための、第(4) 項に記載の 1) ~ 4) のいずれか一つの抗体の使用。

(37) 第(5) 項~第(9) 項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩を

有効成分として含有する慢性閉塞性肺疾患(COPD)の予防および／または治療剤。

(38) 第(5)項～第(9)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩の有効量を投与することを特徴とする、慢性閉塞性肺疾患(COPD)の予防および／または治療方法。

(39) 慢性閉塞性肺疾患(COPD)の予防および／または治療剤の製造のための第(5)項～第(9)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩の使用。

(40) 第(5)項～第(9)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する関節炎の予防および／または治療剤。

(41) 第(5)項～第(9)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩の有効量を投与することを特徴とする、関節炎の予防および／または治療方法。

(42) 関節炎の予防および／または治療剤の製造のための第(5)項～第(9)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩の使用。

(43) 第(5)項～第(9)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する敗血症の予防および／または治療剤。

(44) 第(5)項～第(9)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩の有効量を投与することを特徴とする、敗血症の予防および／または治療方法。

(45) 敗血症の予防および／または治療剤の製造のための第(5)項～第(9)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩の使用。

(46) 第(5)項～第(9)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する急性呼吸窮迫症候群(ARDS)の予防および／または

治療剤。

(47) 第(5)項～第(9)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩の有効量を投与することを特徴とする、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)の予防および/または治療方法。

(48) 急性呼吸窮迫症候群(ARDS)の予防および/または治療剤の製造のための第(5)項～第(9)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩の使用。

すなわち、本発明により、第(14)項～第(18)項に記載される新規な含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩が提供され、それらを有効成分として含有する医薬、および配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能の抑制剤が提供される。また、好中球性炎症疾患治療剤のスクリーニング法も提供される。

本発明者らは、GPCRであるGPR4の有するシグナル伝達に関する機能を抑制する物質が、好中球性炎症疾患の予防および/または治療に有効であるとの新知見を見出し、本発明を完成するに至った。また、本発明者らは、構成活性型のGPCRであるGPR4の構成的活性を抑制する物質の探索を行い、GPR4の構成的活性を抑制する物質が、好中球性炎症疾患の予防および/または治療に有効であることを見出した。

GPR4の有するシグナル伝達に関する機能を抑制する物質としては、GPR4自身の発現を阻害または抑制する物質、リガンドのGPR4への結合を阻害する物質、GPR4へのリガンド結合により生ずるシグナル伝達[例えば、細胞内cAMP濃度の変化、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変化、mitogen-activated protein (MAP)キナーゼのリン酸化等が含まれる]を抑制する物質、GPR4の構成的活性により生ずるシグナル伝達を抑制する物質(例えばGPR4のインバースアゴニスト等が含まれる)、抗体依存性細胞障害活性(ADCC活性)等によりGPR4発現細胞を減少させる物質等が含まれる。上記物質は、これら機能を有する物質であれば、その構造は特に限定されず、公知の構造を有するものでもよい。GPR4

としては、例えば配列番号11、13および17から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、あるいは配列番号11、13および17から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列を有し、かつ配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を有する蛋白質等が挙げられる。

好中球性炎症疾患としては、COPD、虚血再灌流障害、肺気腫、慢性気管支炎、ARDS、ALI、鼻炎、サルコイドーシス、間質性肺炎、肺繊維症、敗血症、関節炎、関節リウマチ、ベーチェット病、シェーングレン症候群、強皮症、乾癬、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、蕁麻疹、血管炎、紅斑、結膜炎、好酸球増多症、ブドウ膜炎、円形脱毛症、湿疹、扁平苔癬、水疱症、天疱症、直腸炎、好酸球性胃腸炎、肥満細胞症、クローン病、潰瘍性大腸炎、食物アレルギー、多発性硬化症、アテローム性動脈硬化症、AIDS、全身性エリテマトーデス、橋本病、ネフローゼ症候群、重症筋無力症、I型糖尿病、好酸球性筋膜炎、高IgE血漿、ライ病、紫斑病、移植片拒絶、扁平上皮がん、肺がん、嚢胞性繊維症、脳卒中、心臓および末梢肢における再灌流障害、痛風、過敏性腸症候群、炎症性肺疾患、炎症性大腸疾患、肝炎、膵炎、アレルギー、潰瘍、肺繊維症以外の繊維症、偏頭痛、心疾患、循環器疾患、炎症性皮膚疾患、放射線による炎症、髄膜炎等の炎症、虚血（心筋梗塞、脳虚血、骨格筋虚血、腸虚血等）、脳障害、内毒症、石綿沈着症等が挙げられる。

配列番号11、13および17から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列を有し、かつ配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を有する蛋白質は、文献[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989年)（以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す）、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997年)（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す）、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc.



Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等] 記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号11、13および17から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより、取得することができる。

欠失、置換または付加したアミノ酸の数は特に限定されないが、1個～数十個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個である。

配列番号11、13および17から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸残基が欠失、置換または付加したとは、該アミノ酸配列中の任意かつ1もしくは複数の位置において、1または複数のアミノ酸残基の欠失、置換または付加があることを意味し、欠失、置換または付加が同時に生じてもよく、欠失、置換または付加されるアミノ酸残基については、天然型と非天然型とを問わない。天然型アミノ酸残基としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-アルギニン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリンおよびL-システインの各残基等が挙げられる。

以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の好ましい例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、tert-ブチルグリシン、tert-ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G群：フェニルアラニン、チロシン

また、配列番号11、13および17から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸残基が欠失、置換または付加したアミノ酸配列を有する蛋白質が、配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を有するには、そのアミノ酸配列と配列番号11記載のアミノ酸配列とが、少なくとも75%以上、通常は80%以上、好ましくは90%以上、さらには95%以上の同一性を有していることが好ましい。

アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873(1993)]やFASTA[Methods Enzymol., 183, 63 (1990)]を用いて決定することができる。このアルゴリズムBLASTに基づいて、BLASTN（塩基対塩基データベース）やBLASTX（塩基対アミノ酸データベース）とよばれるプログラムが開発されている[J. Mol. Biol., 215, 403(1990)]。BLASTに基づいたBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメーターは例えばscore=100、wordlength=12とする。また、BLASTに基づいてBLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる[Gapped BLASTについては文献(Nuc. Acids Res., 25, 3389-3402 (1997))を参照]。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>参照)。

GPR4自身の発現を阻害または抑制する物質としては、例えば、配列番号12、14および18から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列から選ばれる連続した15~60塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するオリゴヌクレオチド（以下、アンチセンス・オリゴヌクレオチドともいう）、配列番号12、14および18から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質の発現を阻害または抑制するオリゴヌクレオチド、これらのオリゴヌクレオチドの誘導体（以下、オリゴヌクレオチド誘導体という）等が挙げられる。

上記アンチセンス・オリゴヌクレオチドとしては、配列番号12、14および

18から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列から選ばれる連続した15～60塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチドであれば特に限定されないが、好ましくは17～60塩基、より好ましくは20～60塩基、さらに好ましくは30～60塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチドが挙げられる。特に好ましくは上記オリゴヌクレオチドの翻訳開始領域の相補的配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチドが挙げられる。該アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、配列番号12、14および18から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列またはその断片の塩基配列に関する情報に基づき、常法により、例えばDNA合成機を用いることにより調製することができる。

オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5' ホスホアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステルとの結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾリルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等をあげることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

上記アンチセンス・オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体を用い、アンチセンスRNA/DNA技術〔バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)〕、トリプル・ヘリックス技術〔Trends in

Biotechnology, 10, 132 (1992))、リボザイム技術〔Current Opinion in Chemical Biology, 3, 274 (1999)、FEMS Microbiology Reviews; 23, 257 (1999)、Frontiers in Bioscience, 4, D497 (1999)、Chemistry & Biology, 6, R33 (1999)、Nucleic Acids Research, 26, 5237 (1998)、Trends in Biotechnology, 16, 438 (1998))、あるいはデコイDNA法〔Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine, 56, 563 (1998)、Circulation Research, 82, 1023 (1998)、Experimental Nephrology, 5, 429 (1997)、Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine, 54, 2583 (1996))〕に準じて、GPR4自身の発現を阻害または抑制することができる。

配列番号12、14および18から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチドとは、配列番号12、14および18から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列を有するDNAの一部、または全部をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法、サザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーまたはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0 mol/lの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150 mmol/l塩化ナトリウム、15 mmol/lクエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNA等を挙げることができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズするヌクレオチドとしては、例えば上記BLASTやFASTA等を用いて計算したときに12、14および18から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列を有するDNAの相補的配列を有するDNAと少なくとも75%以上の相同性を有するDNAが好ましく、より好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAを挙げることができる。ヌクレオチドとしては、DNA、RNA等いずれも用いられるがDNAが好適に用いられる。

上記アンチセンス・オリゴヌクレオチドもしくは該アンチセンス・オリゴヌクレオチド誘導体、または配列番号12、14および18から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチドもしくは該ヌクレオチド誘導体を単独でまたはレトロウィルスベクター、アデノウィルスベクター、アデノウィルスアソシエーテッドウィルスベクター等の遺伝子治療用ベクターに挿入した後、下記に記載した常法に従って製剤化したものを好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤として使用することもできる。

遺伝子治療用ベクターを該予防および／または治療剤として用いる場合には、該遺伝子治療用ベクターと遺伝子治療剤に用いる基剤を調合することにより製造することができる〔Nature Genet., 8, 42 (1994)〕。

上記基剤としては、通常注射剤に用いる基剤であればどのようなものでもよく、例えば蒸留水、塩化ナトリウムまたは塩化ナトリウムと無機塩との混合物等の塩溶液、マンニトール、乳糖、デキストラン、ブドウ糖等の糖溶液、グリシン、アルギニン等のアミノ酸溶液、有機酸溶液または塩溶液とグルコース溶液との混合溶液等が挙げられる。また常法に従い、これらの基剤に浸透圧調整剤、pH調整剤、ゴマ油、ダイズ油等の植物油またはレシチンもしくは非イオン界面活性剤等の界面活性剤等の助剤を加えて、溶液、懸濁液または分散液として注射剤を調製してもよい。これらの注射剤を、粉末化、凍結乾燥等の操作により用時溶解用製剤として調製することもできる。

該予防および／または治療剤は、液体の場合はそのまま、固体の場合は、投与直前に、必要により滅菌処理をした上記の基剤に溶解して使用することができる。

投与方法としては、例えば患者の治療部位に吸収されるように、局所的に投与する方法を挙げることができる。また、非ウイルス遺伝子移入法によっても目的とする治療部位にDNAを輸送することができる。

非ウイルス遺伝子移入法としては、リン酸カルシウム共沈法〔Virology, 52, 456-467 (1973); Science, 209, 1414-1422 (1980)〕、マイクロインジェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 77, 5399-5403 (1980); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 7380-7384 (1980); Cell, 27, 223-231 (1981);

Nature, 294, 92-94 (1981)]、リボソームを介した膜融合-介在移入法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413-7417 (1987); Biochemistry, 28, 9508-9514 (1989); J. Biol. Chem., 264, 12126-12129 (1989); Hum. Gene Ther., 3, 267-275 (1992); Science, 249, 1285-1288 (1990); Circulation, 83, 2007-2011 (1992)]、直接DNA取り込みまたは受容体-媒介DNA移入法[Science, 247, 1465-1468 (1990); J. Biol. Chem., 266, 14338-14342 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3655-3659 (1991); J. Biol. Chem., 264, 16985-16987 (1989); BioTechniques, 11, 474-485 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3410-3414 (1990); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4255-4259 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 4033-4037 (1990); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 8850-8854 (1991); Hum. Gene Ther., 3, 147-154 (1991)]等をあげることができる。

リガンドのGPR4への結合を阻害する物質としては、例えば、GPR4を認識する抗体、GPR4に拮抗作用を有する化合物等をあげることができる。

上記抗体としては、GPR4を認識する抗体であればいずれも用いることができるが、GPR4を特異的に認識する抗体が好ましい。また該抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。このような抗体として、例えば、GPR4を認識する中和抗体等をあげることができる。また、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体等も本発明における抗体として用いることができる。GPR4を発現している細胞を減少させて、その機能を抑制する抗体として、例えば、抗体依存性細胞障害活性（ADCC活性）をもつ抗体等をあげることにもできる。

上記抗体は、例えば、以下の方法に準じて調製することができる。

#### (1) ポリクローナル抗体の作製

GPR4またはその部分断片ポリペプチドの精製標品、あるいはGPR4の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

投与する動物としては、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。

該抗原の投与量は動物1匹当たり50～100 $\mu$ gが好ましい。

ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン（keyhole

limpet haemocyanin) や牛チログロブリン等のキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。

該抗原の投与は、1 回目の投与の後1~2週間おきに3~10回行う。各投与後、3~7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法 (ELISA法) : 医学書院刊 (1976年)、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)〕等で確認する。

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

分離、精製する方法としては、遠心分離、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿〔Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)〕、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独でまたは組み合わせて処理する方法が挙げられる。

## (2) モノクローナル抗体の作製

### (a) 抗体産生細胞の調製

免疫に用いたGPR4またはその部分断片ポリペプチドの精製標品、あるいはGPR4の一部のアミノ酸配列を有するペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

該抗体価を示したラットに抗原物質を最終投与した後3~7日目に、脾臓を摘出する。

該脾臓をMEM培地 (日水製薬社製) 中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH7.65) で1~2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

### (b) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。例えば、8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c由来) 骨髓腫細胞株 P3-X63Ag8-U1(以下、P3-U1と略す) [Curr. Topics Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Eur. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495 (1975)] 等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地 [RPMI-1640培地にグルタミン (1.5mmol/l)、2-メルカプトエタノール ( $5 \times 10^{-5}$ mol/l)、ジェンタマイシン ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) および牛胎児血清 (FCS) (CSL社製、10%) を加えた培地 (以下、正常培地という) に、さらに8-アザグアニン ( $15 \mu\text{g/ml}$ ) を加えた培地で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を  $2 \times 10^7$  個以上用いる。

(c) ハイブリドーマの作製

(a) で取得した抗体産生細胞と (b) で取得した骨髓腫細胞を MEM 培地または PBS (リン酸二ナトリウム 1.83g、リン酸一カリウム 0.21g、食塩 7.65g、蒸留水 1リットル、pH7.2) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞 : 骨髓腫細胞 = 5~10 : 1 になるよう混合し、1,200rpm で5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37°C で、 $10^6$  抗体産生細胞あたり、ポリエチレングリコール-1000 (PEG-1000) 2g、MEM 2ml およびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7ml を混合した溶液を 0.2~1ml 添加し、さらに1~2分間毎に MEM 培地 1~2ml を数回添加する。

添加後、MEM 培地を加えて全量が 50ml になるように調製する。該調製液を 900rpm で5分間遠心分離後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかに HAT 培地 [正常培地にヒポキサンチン ( $10^{-4}$ mol/l)、チミジン ( $1.5 \times 10^{-5}$ mol/l) およびアミノプテリン ( $4 \times 10^{-7}$ mol/l) を加えた培地] 100ml 中に懸濁する。

該懸濁液を 96穴培養用プレートに  $100 \mu\text{l}$ /穴ずつ分注し、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター中、37°C で7~14日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとりアンチボディイズ [Antibodies, A



Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988))等に述べられている酵素免疫測定法により、本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

酵素免疫測定法の具体例として、以下の方法をあげることができる。

免疫の際、抗原に用いたGPR4またはその部分断片ポリペプチドの精製標品、あるいはGPR4の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(d)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットまたは抗マウスIgMノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行い、抗原に用いたポリペプチドに特異的に反応するものを本発明で用いられるモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し〔1回目は、HT培地（HAT培地からアミノプテリンを除いた培地）、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明で用いられるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株として選択する。

#### (d)モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (Pristane) 0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、(c)で取得した本発明で用いられるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞 $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。

得られた上清より、ポリクローナル抗体で用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。ポリペプチド量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出する。

上記、GPR4を認識する抗体を含有する好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤は以下のように調製することができる。

該抗体を有効成分として含有する医薬は、該有効成分を単独で投与することも可能ではあるが、通常は該有効成分を薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。好ましくは水、あるいは食塩、グリシン、グルコース、ヒトアルブミン等の水溶液等の水性担体に溶解した無菌的な溶液が用いられる。また、製剤溶液を生理的条件に近づけるための緩衝化剤や等張化剤のような、薬理学的に許容される添加剤、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化カリウム、クエン酸ナトリウム等を添加することもできる。また、凍結乾燥して貯蔵し、使用時に適当な溶媒に溶解させて用いることもできる。

投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または静脈内投与等の非経口投与をあげることができる。投与形態としては、錠剤、注射剤等が挙げられる。

経口投与に適当な製剤としては、錠剤等が挙げられる。錠剤等は、乳糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤、ヒドロキシプロピルセルロース等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤等が挙げられる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液または両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。また、非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $8\text{mg}/\text{kg}$ である。

GPR4の構成的活性により生じるシグナル伝達を抑制する物質は、該構成的活性により生ずるシグナル伝達を抑制することのできる物質を探索することによっても取得することができる。

GPR4に拮抗作用を有する化合物としては、例えば、式(I)で表される化合物が挙げられる。以下、式(I)で表される化合物を化合物(I)という。

他の式番号の化合物についても同様である。

化合物(I)および化合物(II)の各基の定義において、以下の例示が挙げられる。

(i)低級アルキルおよび低級アルカノイル、低級アルコキシ、低級アルコキシカルボニル、モノもしくはジ低級アルキルアミノ、モノもしくはジ低級アルキルアミノカルボニルの低級アルキル部分としては、例えば直鎖または分岐状の炭素数1~10のアルキルが挙げられ、具体的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、イソオクチル、ノニル、デシル等が挙げられる。

(ii)シクロアルキルとしては、例えば炭素数3~8のシクロアルキルが挙げられ、具体的にはシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル等が挙げられる。シクロアルキルカルボニルのシクロアルキル部分は、シクロアルキル(ii)と同義である。

(iii)低級アルケニルとしては、例えば直鎖、分岐または環状の炭素数2~8のアルケニルが挙げられ、具体的にはビニル、アリル、1-プロペニル、ブテニル、ペンテニル、ヘキセニル、ヘプテニル、オクテニル、シクロヘキセニル、2,6-オクタジエニル等が挙げられる。

(iv)低級アルキニルとしては、例えば直鎖または分岐状の炭素数2~8のアルキニルが挙げられ、具体的にはエチニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニル、ヘキシニル、ヘプチニル、オクチニル等が挙げられる。

(v)ハロゲンは、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素の各原子を表す。

(vi)アリールおよびそれぞれが隣接する2つの炭素原子と一緒に形成される芳香環から水素原子を一つ除いた基としては、例えば炭素数6~14の単環性、二環性または三環式のアリールが挙げられ、具体的にはフェニル、ナフチル、インデニル、アントラニル等が挙げられる。

(vii)アラルキルおよび複素環アルキルのアルキレン部分は、前記の低級アルキル(i)の定義から水素原子を一つ除いたものと同義である。

(viii)アラルキルおよびアロイルのアリール部分としては、前記アリール(vi)の定義で挙げた基に加え、例えば前記アリールがシクロアルキルと縮合

した二環性縮合環基が挙げられ、具体的にはインダニル、1,2,3,4-テトラヒドロナフチル、6,7,8,9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプチル等が挙げられる。

(ix)複素環基および複素環アルキルの複素環基部分ならびにそれぞれが隣接する2つの炭素原子と一緒に形成される複素環から水素原子を一つ除いた基としては、例えば窒素原子、酸素原子および硫黄原子から選ばれる少なくとも1個の原子を含む5員または6員の単環性複素環基、3~8員の環が縮合した二環または三環式であって窒素原子、酸素原子および硫黄原子から選ばれる少なくとも1個の原子を含む縮環性複素環基等が挙げられ、具体的にはピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、ベンゾイミダゾリル、2-オキソベンゾイミダゾリル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾフリル、ベンゾチエニル、プリニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾジオキサリル、インダゾリル、インドリル、イソインドリル、キノリル、イソキノリル、フタラジニル、ナフチルリジニル、キノキサリニル、ピロリル、ピラゾリル、キナゾリニル、シンノリニル、トリアゾリル、テトラゾリル、イミダゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、チエニル、フリル、ピロリジニル、2,5-ジオキソピロリジニル、チアゾリジニル、オキサゾリジニル、ピベリジル、ピベリジノ、ピベラジニル、ホモピベラジニル、ホモピベリジル、ホモピベリジノ、モルホリニル、モルホリノ、チオモルホリニル、チオモルホリノ、ピラニル、テトラヒドロピリジル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロキノリル、テトラヒドロイソキノリル、オクタヒドロキノリル、インドリニル等が挙げられる。

(x)隣接する窒素原子と一緒に形成される複素環基としては、例えば少なくとも1個の窒素原子を含む5員または6員の単環性複素環基(該単環性複素環基は、他の窒素原子、酸素原子または硫黄原子を含んでいてもよい)、3~8員の環が縮合した二環または三環式で少なくとも1個の窒素原子を含む縮環性複素環基(該縮環性複素環基は、他の窒素原子、酸素原子または硫黄原子を含んでいてもよい)等が挙げられ、具体的にはピリジル、テトラヒドロピリジル、インドリニル、イソインドリニル、ピロリジニル、チアゾリ

ジニル、オキサゾリジニル、ピベリジノ、ホモピベリジノ、ピベラジニル、ホモピベラジニル、モルホリノ、チオモルホリノ、ベルヒドロアゼピニル、ベルヒドロアゾシニル、テトラヒドロキノリル、テトラヒドロイソキノリル、オクタヒドロキノリル、ベンゾイミダゾリル、インダゾリル、インドリル、イソインドリル、プリニル、ジヒドロインドリル、ピロリル、ジヒドロピロリル、ピラゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、イミダゾリル等が挙げられる。

(xi) 置換低級アルキル、置換低級アルコキシカルボニルおよび置換低級アルカノイルにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数1～3の、シクロアルキル、低級アルカノイル、低級アルコキシ、アリアルオキシ、置換アリアルオキシ〔該置換アリアルオキシにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数1～3の、低級アルキル、低級アルコキシ、低級アルコキシカルボニル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ等が挙げられる。ここで低級アルキルは前記低級アルキル(i)と同義であり、ハロゲンは前記ハロゲン(v)と同義であり、低級アルコキシおよび低級アルコキシカルボニルの低級アルキル部分は前記低級アルキル(i)と同義である〕、アラルキルオキシ、置換アラルキルオキシ〔該置換アラルキルオキシにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数1～3の、低級アルキル、低級アルコキシ、低級アルコキシカルボニル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ等が挙げられる。ここで低級アルキルは前記低級アルキル(i)と同義であり、ハロゲンは前記ハロゲン(v)と同義であり、低級アルコキシおよび低級アルコキシカルボニルの低級アルキル部分は前記低級アルキル(i)と同義である〕、低級アルカノイルオキシ、低級アルコキシカルボニル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、低級アルキルチオ、置換低級アルキル〔該置換低級アルキルにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数1～3のヒドロキシ、ハロゲン等が挙げられる〕、置換低級アルカノイル〔該置換低級アルカノイルにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数1～3のハロゲン等が挙げられる〕、モノまたはジ低級アルキルアミノ、低級アルキルスルホニル、低級アルキルスルフィニル、

低級アルコキシカルボニルアミノ、低級アルカノイルアミノ、モノまたはジ低級アルキルアミノカルボニル、モノまたはジ低級アルキルアミノカルボニルオキシ、複素環基等が挙げられる。

ここで示したアリールオキシおよびアラルキルオキシのアリール部分、シクロアルキル、ハロゲン、複素環基、ならびに低級アルカノイル、低級アルコキシ、低級アルカノイルオキシ、低級アルコキシカルボニル、低級アルキルチオ、低級アルキルスルホニル、低級アルキルスルフィニル、低級アルコキシカルボニルアミノおよび低級アルカノイルアミノの低級アルキル部分は、それぞれ前記アリール(vi)、シクロアルキル(ii)、ハロゲン(v)、複素環基(ix)、および低級アルキル(i)と同義であり、アラルキルオキシのアルキレン部分は、前記低級アルキル(i)から水素原子を一つ除いたものと同義である。

モノまたはジ低級アルキルアミノ、モノまたはジ低級アルキルアミノカルボニルおよびモノまたはジ低級アルキルアミノカルボニルオキシの低級アルキル部分は、それぞれ前記低級アルキル(i)と同義であり、ジ低級アルキルアミノ、ジ低級アルキルアミノカルボニルおよびジ低級アルキルアミノカルボニルオキシの2つの低級アルキル部分は、それぞれ同一でも異なってもよい。

(xii)置換アリール、置換アラルキル、置換アロイル、置換シクロアルキル、置換低級アルケニル、置換低級アルキニル、置換複素環基、置換複素環アルキル、隣接する窒素原子と一緒に形成される置換複素環基、それぞれが隣接する2つの炭素原子と一緒に形成される置換芳香環およびそれぞれが隣接する2つの炭素原子と一緒に形成される置換複素環における置換基としては、前記置換低級アルキルにおける置換基(xi)の定義で挙げた基に加え、低級アルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、置換アラルキル、複素環基、置換複素環基、複素環アルキル、置換複素環アルキル等が挙げられる。さらに、置換アリールおよび隣接する窒素原子と一緒に形成される置換複素環基における置換基は低級アルキル[該低級アルキルは前記低級アルキル(i)と同義である]または置換低級アルキル[該低級アルキルは前記低級アルキル(i)と同義であり、該置換低級アルキルに

おける置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数1~3の、ハロゲン、ヒドロキシ、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル等が挙げられる。ここでハロゲンは前記ハロゲン(v)と同義であり、低級アルコキシカルボニルの低級アルキル部分は前記低級アルキル(i)と同義である]であってもよい。

ここで示した低級アルキル、アリール、複素環基および複素環アルキルの複素環基部分、アラルキルおよび複素環アルキルのアルキレン部分ならびにアラルキルのアリール部分は、それぞれ前記低級アルキル(i)、アリール(vi)、複素環基(ix)、アラルキルのアルキレン部分(vii)およびアラルキルのアリール部分(viii)と同義である。また、置換基(xi)の定義で挙げた基に加えた「低級アルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、置換アラルキル、複素環基、置換複素環基、複素環アルキル、置換複素環アルキル」における置換アリール、置換アラルキル、置換複素環基および置換複素環アルキルにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数1~3の、低級アルキル[該低級アルキルは前記低級アルキル(i)と同義である]、低級アルコキシ[該低級アルコキシの低級アルキル部分は前記低級アルキル(i)と同義である]、ハロゲン[該ハロゲンは前記ハロゲン(v)と同義である]等が挙げられる。

(xiii) フェニレンとしては、1,2-フェニレン、1,3-フェニレン、1,4-フェニレンが挙げられる。

(xiv) ナフチレンとしては、1,2-ナフチレン、1,3-ナフチレン、1,4-ナフチレン、1,5-ナフチレン、1,6-ナフチレン、1,7-ナフチレン、1,8-ナフチレンが挙げられる。

(xv) 炭素数2~6で窒素、酸素および硫黄から任意に選ばれる原子数1~4である不飽和もしくは部分的に不飽和の5~7員の単環式複素環としては、以下の例示に限定されることはないが、例えばピロール、イミダゾール、ピラゾール、ピリジン、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、1,2,4-トリアジン、1,2,3-トリアジン、1,3,5-トリアジン、テトラゾール、フラン、ピラン、オキサゾール、イソオキサゾール、1,2,3-オキサジアゾール、1,2,4-オキサジアゾール、1,3,4-オキサジアゾール、チオフェン、チアゾール、イソチアゾ

ール、1,2,3-チアジアゾール、1,2,4-チアジアゾール、1,3,4-チアジアゾール、フラザン、チオピラン、ピロリジン、ピロリン、ピロリドン、ピペリドン、ピペリジン、ホモピペリジン、ピペラジン、ホモピペラジン、イミダゾリジン、ピラゾリジン、ピラゾリン、テトラヒドロピリジン、テトラヒドロピラン、テトラヒドロフラン、ジオキサン、モルホリン、チオモルホリン等が挙げられる。

(xvi) 炭素数4~10で窒素、酸素および硫黄から任意に選ばれる原子数1~4である不飽和もしくは部分的に不飽和の環構成原子数が8~11の二環式複素環としては、必ずしも以下の例示に限定されることはないが、例えばインドール、イソインドール、ベンゾイミダゾール、キノリン、イソキノリン、キノリジン、キナゾリン、インドリジン、ナフチリジン、キノキサリン、シンノリン、プテリジン、インダゾール、プリン、フタラジン、インドリン、イソインドリン、ベンゾフラン、イソベンゾフラン、クロマン、イソクロマン、クロメン、ベンゾジオキサン、ベンゾチオフエン、ベンゾオキサゾール、ベンゾチアゾール、キノロン、テトラヒドロキノリン、テトラヒドロイソキノリン、オクタヒドロキノリン、ピリドピリミジン、テトラヒドロピリドピリミジン、ベンズアゼピン、テトラヒドロベンゾアゼピン、ベンゾジアゼピン、テトラヒドロベンゾジアゼピン、ベンゾオキセピン、テトラヒドロベンゾオキセピン、ベンゾオキサゼピン、テトラヒドロベンゾオキサゼピン、ベンゾチエピン、テトラヒドロベンゾチエピン、ベンゾチアゼピン、テトラヒドロベンゾチアゼピン、ピロロピリジン、ピロロピリミジン、フロピリジン、フロピリミジン、チエノピリジン、チエノピリミジン、イミダゾピリジン、1,3-ベンゾジオキサゾール、1,3-ベンゾジチアゾール、1,3-オキサチオロベンゼン等が挙げられる。

(xvii) 置換もしくは非置換のフェニレン、置換もしくは非置換のナフチレン、炭素数2~6で窒素、酸素および硫黄から任意に選ばれる原子数1~4である置換の不飽和もしくは部分的に不飽和の5~7員の単環式複素環、および炭素数4~10で窒素、酸素および硫黄から任意に選ばれる原子数1~4である置換の不飽和もしくは部分的に不飽和の環構成原子数が8~11の二環式複素環における置換基としては、前記置換低級アルキルにおける置換基 (xi) の定



義で挙げた基に加え、アリール（該アリールは前記アリール(vi)と同義である）、置換アリール〔該アリールは前記アリール(vi)と同義であり、該置換アリールにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数1～3の、低級アルキル（該低級アルキルは前記低級アルキル(i)と同義である）、低級アルコキシ（該低級アルコキシの低級アルキル部分は前記低級アルキル(i)と同義である）、ハロゲン（該ハロゲンは前記ハロゲン(v)と同義である）等が挙げられる〕、アラルキル（該アラルキルのアルキレン部分および該アラルキルのアリール部分は、それぞれ前記アラルキルのアルキレン部分(vii)および前記アラルキルのアリール部分(viii)と同義である）、置換アラルキル〔該アラルキルのアルキレン部分および該アラルキルのアリール部分はそれぞれ前記アラルキルのアルキレン部分(vii)および前記アラルキルのアリール部分(viii)と同義であり、該置換アラルキルにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数1～3の、低級アルキル（該低級アルキルは前記低級アルキル(i)と同義である）、低級アルコキシ（該低級アルコキシの低級アルキル部分は前記低級アルキル(i)と同義である）、ハロゲン（該ハロゲンは前記ハロゲン(v)と同義である）等が挙げられる〕、置換複素環基〔該複素環基は前記複素環基(ix)と同義であり、該置換複素環基における置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数1～3の、低級アルキル（該低級アルキルは前記低級アルキル(i)と同義である）、低級アルコキシ（該低級アルコキシの低級アルキル部分は前記低級アルキル(i)と同義である）、ハロゲン（該ハロゲンは前記ハロゲン(v)と同義である）等が挙げられる〕、複素環アルキル（該複素環アルキルの複素環基部分および該複素環アルキルのアルキレン部分は、それぞれ前記複素環基(ix)および前記アラルキルのアルキレン部分(vii)と同義である）、置換複素環アルキル〔該複素環アルキルの複素環基部分および該複素環アルキルのアルキレン部分は、それぞれ前記複素環基(ix)および前記アラルキルのアルキレン部分(vii)と同義であり、該置換複素環アルキルにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数1～3の、低級アルキル（該低級アルキルは前記低級アルキル(i)と同義である）、低級アルコキシ（該低級アルコキシの低級アルキル部分は前記低級アルキル(i)と同義である）、ハロゲ

ン（該ハロゲン（v）と同義である）等が挙げられる」等が挙げられる。

前記の炭素数2～6で窒素、酸素および硫黄から任意に選ばれる原子数1～4である置換の不飽和もしくは部分的に不飽和の5～7員の単環式複素環、および前記の炭素数4～10で窒素、酸素および硫黄から任意に選ばれる原子数1～4である置換の不飽和もしくは部分的に不飽和の環構成原子数が8～11の二環式複素環における置換基としては上記置換基に加えて、低級アルキル（該低級アルキルは前記低級アルキル（i）と同義である）、置換低級アルキル（該低級アルキルは前記低級アルキル（i）と同義であり、該置換低級アルキルにおける置換基としては前記置換低級アルキルにおける置換基（xi）の定義からヒドロキシおよびハロゲンを除いた基等が挙げられる）、置換シクロアルキル（該シクロアルキルは前記シクロアルキル（ii）と同義であり、該置換シクロアルキルにおける置換基は前記置換シクロアルキルにおける置換基（xii）と同義である）、低級アルケニル（該低級アルケニルは前記低級アルケニル（iii）と同義である）、置換低級アルケニル（該低級アルケニルは前記低級アルケニル（iii）と同義であり、該置換低級アルケニルにおける置換基は前記置換低級アルケニルにおける置換基（xii）と同義である）、低級アルキニル（該低級アルキニルは前記低級アルキニル（iv）と同義である）、置換低級アルキニル（該低級アルキニルは前記低級アルキニル（iv）と同義であり、該置換低級アルキニルにおける置換基は前記置換低級アルキニルにおける置換基（xii）と同義である）、置換アリール（該アリールは前記アリール（vi）と同義であり、該置換アリールにおける置換基としては前記置換アリールにおける置換基（xii）の定義から、低級アルキル、低級アルコキシおよびハロゲンを除いた基等が挙げられる）、置換アラルキル（該アラルキルのアリール部分および該アラルキルのアルキレン部分は、それぞれ前記アリール（vi）および前記アラルキルのアルキレン部分（vii）と同義であり、該置換アラルキルにおける置換基としては前記置換アラルキルにおける置換基（xii）の定義から低級アルキル、低級アルコキシおよびハロゲンを除いた基等が挙げられる）、アロイル（該アロイルは前記アロイル（viii）と同義である）、置換アロイル（該アロイルは前記アロイル

(viii)と同義であり、該置換アロイルにおける置換基は、前記置換アロイルにおける置換基 (xii) と同義である)、置換複素環基 (該複素環基は前記複素環基 (ix) と同義であり、該置換複素環基における置換基は前記置換複素環基における置換基 (xii) の定義から、低級アルキル、低級アルコキシおよびハロゲンを除いた基等が挙げられる)、置換複素環アルキル (該複素環アルキルの複素環基部分および該複素環アルキルのアルキレン部分はそれぞれ前記複素環アルキルの複素環基部分 (ix) および前記複素環アルキルのアルキレン部分 (vii) と同義であり、該置換複素環アルキルにおける置換基は前記置換複素環アルキルにおける置換基 (xii) の定義から、低級アルキル、低級アルコキシおよびハロゲンを除いた基等が挙げられる) であってもよい。

化合物 (I) の四級アンモニウム塩としては、化合物 (I) における塩基性窒素含有官能基にハロゲン化低級アルキル (該低級アルキルおよび該ハロゲンはそれぞれ前記と同義である)、ハロゲン化アラルキル (該ハロゲンおよび該アラルキルはそれぞれ前記と同義である)、ヒドロキシ低級アルキル (該低級アルキルは前記と同義である)、ハロゲン化低級アルケニル (該低級アルケニルおよび該ハロゲンはそれぞれ前記と同義である) 等が付加した四級アンモニウム塩であれば特に限定されないが、例えばジメチルアミノ基を有する化合物 (I) にヨウ化メチルを作用させて得られる四級アンモニウム塩、ピペリジノ基を有する化合物 (I) にヨウ化メチルを作用させて得られる四級アンモニウム塩、ピロリジノ基を有する化合物 (I) にヨウ化メチルを作用させて得られる四級アンモニウム塩、モルホリノ基を有する化合物 (I) に臭化ベンジルを作用させて得られる四級アンモニウム塩、ピロリジノ基を有する化合物 (I) にヨウ化エチルを反応させて得られる四級アンモニウム塩においてヨウ化物イオンと水酸化物イオンが交換されて得られる四級アンモニウム塩等が挙げられる。また、化合物 (I) の四級アンモニウム塩の具体的な一態様としては、化合物 (I) の置換基 $R^1$ が $-NR^5R^6$  (式中、 $R^5$ および $R^6$ はそれぞれ前記と同義である) である場合に、ハロゲン化低級アルキル (該低級アルキルおよび該ハロゲンはそれぞれ前記と同義である)、ハロゲン化アラルキル (該ハロゲンおよび該アラルキルはそれぞれ前記と同義である)、

ヒドロキシ低級アルキル（該低級アルキルは前記と同義である）、ハロゲン化低級アルケニル（該低級アルケニルおよび該ハロゲンはそれぞれ前記と同義である）等が該-NR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>部に付加して、置換基R<sup>1</sup>に相当する箇所が-N<sup>+</sup>R<sup>5b</sup>R<sup>6b</sup>R<sup>8</sup>（式中、R<sup>5b</sup>およびR<sup>6b</sup>はそれぞれ前記R<sup>5</sup>および前記R<sup>6</sup>と同義であり、R<sup>8</sup>は低級アルキル、低級アルケニルまたはアラルキルを表す）に変換された化合物等が挙げられる。

化合物(I)もしくはその四級アンモニウム塩の薬理学的に許容される塩としては、毒性のない、水溶性のものが好ましく、例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、硝酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、クエン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、リンゴ酸塩、シュウ酸塩、メタンスルホン酸塩、酒石酸塩等の有機酸塩等の酸付加塩、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、亜鉛塩等の金属塩、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム等のアンモニウム塩、モルホリン付加塩、ピペリジン付加塩等の有機アミン付加塩、またはグリシン付加塩、フェニルアラニン付加塩、リジン付加塩、アスパラギン酸付加塩、グルタミン酸付加塩等のアミノ酸付加塩等が挙げられる。

化合物(II)の四級アンモニウム塩としては、化合物(II)における塩基性窒素含有官能基にハロゲン化低級アルキル（該低級アルキルおよび該ハロゲンはそれぞれ前記と同義である）、ハロゲン化アラルキル（該ハロゲンおよび該アラルキルはそれぞれ前記と同義である）、ヒドロキシ低級アルキル（該低級アルキルは前記と同義である）、ハロゲン化低級アルケニル（該低級アルケニルおよび該ハロゲンはそれぞれ前記と同義である）等が付加した四級アンモニウム塩であれば特に限定されないが、例えばジメチルアミノ基を有する化合物(II)にヨウ化メチルを作用させて得られる四級アンモニウム塩、ピペリジノ基を有する化合物(II)にヨウ化メチルを作用させて得られる四級アンモニウム塩、ピロリジノ基を有する化合物(II)にヨウ化メチルを作用させて得られる四級アンモニウム塩、モルホリノ基を有する化合物(II)に臭化ベンジルを作用させて得られる四級アンモニウム塩、ピロリジノ基を有する化合物(II)にヨウ化エチルを反応させて得られる四級アンモ

ニウム塩においてヨウ化物イオンと水酸化物イオンが交換されて得られる四級アンモニウム塩等が挙げられる。

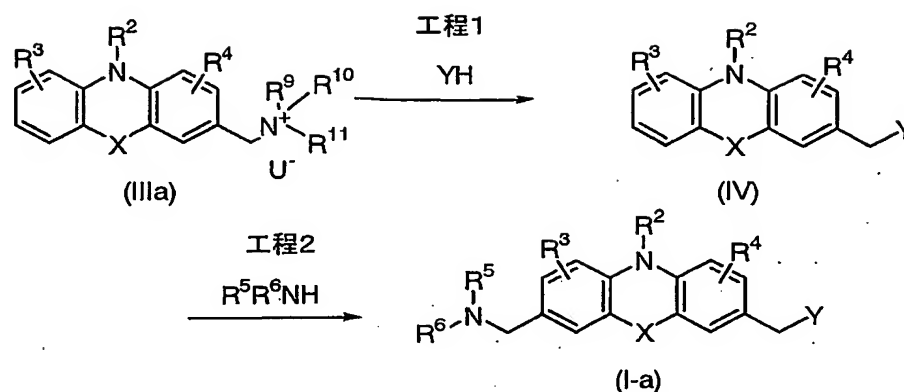
化合物(II)もしくはその四級アンモニウム塩の薬理的に許容される塩としては、毒性のない、水溶性のものが好ましく、例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、硝酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、クエン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、リンゴ酸塩、シュウ酸塩、メタンスルホン酸塩、酒石酸塩等の有機酸塩等の酸付加塩、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、亜鉛塩等の金属塩、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム等のアンモニウム塩、モルホリン付加塩、ピペリジン付加塩等の有機アミン付加塩、またはグリシン付加塩、フェニルアラニン付加塩、リジン付加塩、アスパラギン酸付加塩、グルタミン酸付加塩等のアミノ酸付加塩等が挙げられる。

次に化合物(I)の製造法について説明する。

なお、以下に示した製造法において、定義した基が反応条件下変化するか、または方法を実施するのに不適切な場合、有機合成化学で常用される方法、例えば官能基の保護、脱保護等 [例えば、プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス 第三版 (Protective Groups in Organic Synthesis, the third edition)、グリーン (T.W.Greene)、ワッツ (Peter G.M.Wuts) 著、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ・インコーポレイテッド (John Wiley & Sons Inc.) (1999年)] の手段に付すことにより容易に製造を実施することができる。また、必要に応じて置換基導入等の反応工程の順序を変えることもできる。

化合物 (I-a) は、以下に示す製造方法によって得ることができる。

#### 製造法 1



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $X$ および $Y$ はそれぞれ前記と同義であり、 $R^9$ は低級アルキル、アリールまたはベンジルを表し、 $R^{10}$ および $R^{11}$ は同一または異なって低級アルキルまたはシクロアルキルを表すか、 $R^{10}$ および $R^{11}$ が隣接する窒素原子と一緒になって複素環基を形成し、 $U$ はハロゲン、アルコキシスルホニルオキシ、アリールオキシスルホニルオキシ、アルキルスルホニルオキシまたはアリールスルホニルオキシを表す)

上記の定義において、低級アルキル、シクロアルキルおよびハロゲンはそれぞれ前記と同義である。アルコキシスルホニルオキシおよびアルキルスルホニルオキシのアルキル部分、アリールオキシスルホニルオキシおよびアリールスルホニルオキシのアリール部分は、それぞれ前記低級アルキルおよびアリールと同義である。隣接する窒素原子と一緒になって形成される複素環基は前記と同義である。

#### <工程 1>

化合物 (IIIa) を原料として用い、特開平7-61983に開示された方法に従い、1当量～大過剰の $YH$  (式中、 $Y$ は前記と同義である) と反応させることにより、化合物 (IV) を得ることができる。なお、化合物 (IIIa) は特開平7-61983に開示された方法またはそれに準じた方法により合成することができる。

#### <工程 2>

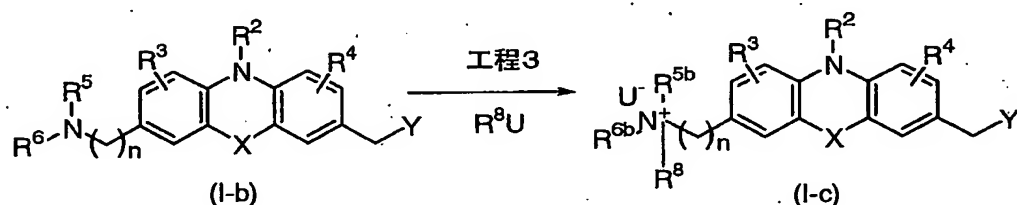
化合物 (IV) を不活性溶媒中、1当量～大過剰のホルムアルデヒド水溶液

存在下に、1当量～大過剰の $R^5R^6NH$ （式中、 $R^5$ および $R^6$ はそれぞれ前記と同義である）またはその塩酸塩と反応させることにより、化合物（I-a）を得ることができる。また、ホルムアルデヒド水溶液に代え、トリオキシメチレン、パラホルムアルデヒド等のホルムアルデヒド等価体を用いることもできる。

反応は通常、酸性条件下で良好に進行するので、必要に応じて塩酸、酢酸、トリフルオロ酢酸等の酸を反応系内に添加するのが好ましい。反応は通常、 $0^{\circ}C$ から反応に用いた溶媒の沸点の間の温度、好ましくは室温～ $80^{\circ}C$ の間の温度で行い、5分間から100時間で終了する。不活性溶媒としては、例えば水、メタノール、エタノール、酢酸、トリフルオロ酢酸、ジクロロエタン、クロロホルム、テトラヒドロフラン、ジメチルアセトアミド、ジメチルホルムアミド、アセトン等を単独でまたは混合して用いることができ、好ましくはクロロホルムと酢酸の混合溶媒が用いられる。

化合物（I-b）から、以下に示す方法によって化合物（I-c）を製造することができる。

#### 製造法 2



（式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^{5b}$ 、 $R^{6b}$ 、 $R^8$ 、 $U$ 、 $n$ 、 $X$ および $Y$ はそれぞれ前記と同義である）

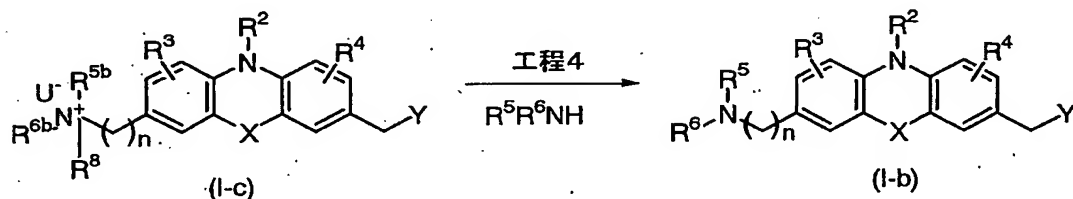
#### <工程 3>

化合物（I-b）を不活性溶媒中、1当量～大過剰の $R^8U$ （式中、 $R^8$ および $U$ はそれぞれ前記と同義である）と、通常 $-10^{\circ}C$ から反応に用いた溶媒の沸点の間の温度、好ましくは室温で、1～48時間反応させることにより、化合物（I-c）を得ることができる。

不活性溶媒としては、例えば水、メタノール、エタノール、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、ヘキサン、アセトニトリル、ジクロロメタン、ジクロロエタン、クロロホルム、四塩化炭素、1,4-ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジメチルアセトアミド、ジメチルホルムアミド、アセトン等を単独でまたは混合して用いることができ、好ましくは酢酸エチル、ジクロロメタン、クロロホルム等が用いられる。

化合物 (I-c) から、以下に示す方法によって化合物 (I-b) を製造することができる。

#### 製造法 3'



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^{5b}$ 、 $R^{6b}$ 、 $R^8$ 、 $U$ 、 $n$ 、 $X$ および $Y$ はそれぞれ前記と同義である)

#### <工程 4>

化合物 (I-c) を不活性溶媒中、1当量～大過剰の $R^5R^6NH$  (式中、 $R^5$ および $R^6$ はそれぞれ前記と同義である) と、通常 $-10^\circ\text{C}$ から反応に用いた溶媒の沸点の間の温度、好ましくは $20^\circ\text{C}$ ～ $100^\circ\text{C}$ の間の温度で、1～100時間反応させることにより、化合物 (I-b) を得ることができる。

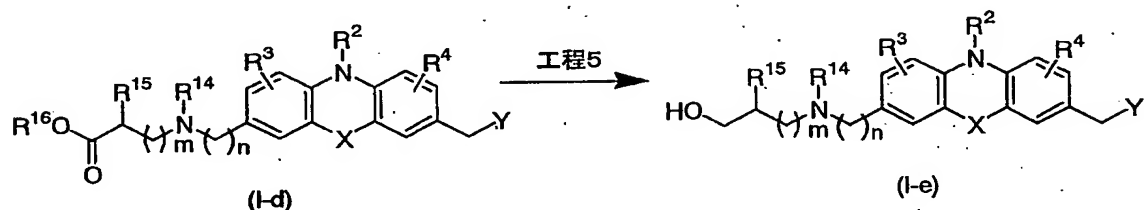
不活性溶媒としては、例えば水、メタノール、エタノール、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、ヘキサン、アセトニトリル、ジクロロメタン、ジクロロエタン、クロロホルム、四塩化炭素、1,4-ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジメチルアセトアミド、ジメチルホルムアミド、アセトン等が単独でまたは混合して用いられ、好ましくはクロロホルム、ジメチルホルムアミド等が用いられる。反応は通常、塩基性条件下で良好に進行するの



で、必要に応じて適当な塩基を反応系内に添加することが望ましい。適当な塩基としては、例えばトリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、N-メチルモルホリン、炭酸カリウム、水素化ナトリウム、水素化カリウム、水素化カルシウム、ジイソプロピルエチルアミン、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデック-7-エン等を用いることができ、中でもトリエチルアミンが好ましい。

化合物(I-b)中、化合物(I-d)から、以下に示す方法によって化合物(I-e)を製造することができる。

#### 製造法 4



(式中、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $n$ 、 $\text{X}$ および $\text{Y}$ はそれぞれ前記と同義であり、 $\text{R}^{14}$ および $\text{R}^{15}$ は同一または異なって水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表すか、 $\text{R}^{14}$ および $\text{R}^{15}$ が隣接する $\text{CH}(\text{CH}_2)_m\text{N}$ と一緒に置換もしくは非置換の複素環を形成し、 $\text{R}^{16}$ は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換のアリールを表し、 $m$ は0~3の整数を表す)

上記の定義において、低級アルキル、シクロアルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、アラルキル、複素環アルキル、およびアリールはそれぞれ前記と同義であり、それらの置換基もそれぞれ前記と同義である。

$R^{14}$ および $R^{15}$ が隣接する $CH(CH_2)_mN$ と一緒に形成される複素環としては、テトラヒドロピリジン、ピロリジン、ピペリジン、ホモピペリジン、ピペラジン、ホモピペラジン、モルホリン、チオモルホリン、ペルヒドロアゼピン、ペルヒドロアゾシン、テトラヒドロキノリン、テトラヒドロイソキノリン等があげられ、それらの置換基は前記の隣接する窒素原子と一緒に形成される複素環基の置換基と同義である。

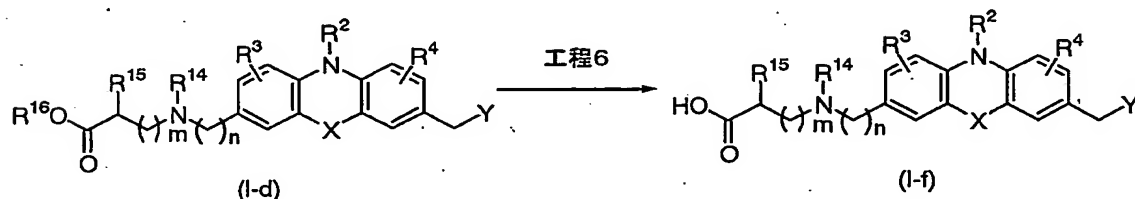
#### <工程 5>

化合物(I-d)を不活性溶媒中、通常 $-78^{\circ}C \sim 40^{\circ}C$ の間の温度で、2~4 当量の水素化アルミニウムリチウム、ジイソプロピル水素化アルミニウムリチウム等、好ましくはジイソプロピル水素化アルミニウムリチウム等の還元剤存在下で 10 分間~24 時間、好ましくは 1~3 時間処理することにより化合物(I-e)を得ることができる。

不活性溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、ジクロロエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル等を単独でまたは混合して用いることができ、好ましくはジクロロメタンまたはトルエンが用いられる。

化合物(I-d) から以下に示す方法によって化合物(I-f)を製造することができる。

#### 製造法 5



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^{14}$ 、 $R^{15}$ 、 $R^{16}$ 、 $n$ 、 $X$ 、 $Y$ および $m$ はそれぞれ前記と同義である)

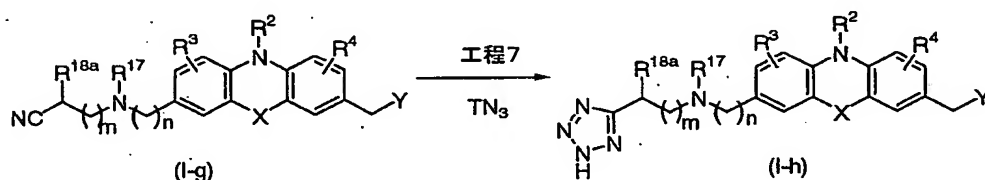
#### <工程 6>

化合物(I-d)を不活性溶媒中、通常0℃から反応に用いた溶媒の沸点の間の温度、好ましくは室温～100℃の間の温度で、1当量～大過剰の適当な塩基存在下、1～48時間、好ましくは1～3時間処理することにより化合物(I-f)を得ることができる。

適当な塩基としては、例えば水酸化ナトリウム、水酸化リチウム、水酸化カリウム、炭酸カリウム、炭酸セシウム、ナトリウムメトキシド等が例示され、好ましくは水酸化ナトリウムが挙げられる。不活性溶媒としては、例えば水、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、メタノール、エタノール、プロパノール、ジクロロメタン、ジクロロエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン等を単独でまたは混合して用いることができ、好ましくはテトラヒドロフランもしくはメタノール、またはそれらと水の混合溶媒が用いられる。

化合物(I-b)中、化合物(I-g)から以下に示す方法によって化合物(I-h)を製造することができる。

#### 製造法6



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $n$ 、 $X$ 、 $Y$ および $m$ はそれぞれ前記と同義であり、 $R^{17}$ および $R^{18a}$ はそれぞれ前記 $R^{14}$ および前記 $R^{15}$ と同義であり、 $T$ はアルカリ金属、アンモニウム、トリアルキルシリル、またはトリアルキルチンを表す)

上記の定義においてトリアルキルシリルおよびトリアルキルチンにおけるアルキルは前記低級アルキルと同義である。アルカリ金属としてはナトリウム、カリウム等があげられる。

#### <工程7>

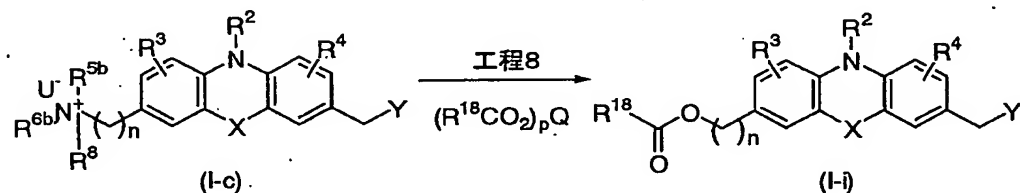
化合物(I-g)を不活性溶媒中、0℃から反応に用いた溶媒の沸点の間の温度、好ましくは室温～200℃の間の温度で、1当量～大過剰、好ましくは2～4当量

の $TN_3$ (式中、Tは前記と同義である)と、通常反応を加速させるために触媒量～大過剰、好ましくは0.5～2当量の適当な添加剤の存在下、1～200時間、好ましくは3～48時間反応させることにより化合物(I-h)を得ることができる。

適当な添加剤としては、例えば四塩化けい素、塩化リチウム、塩化アルミニウム、塩化アンモニウム、塩化トリアルキルすず、酸化ジアルキルすず、トリアルキルアルミニウム、トリエチルアミン・塩酸塩、トリエチルアミン・臭化水素酸塩、水素化ナトリウム、カリウムtert-ブトキシド、水酸化ナトリウム、臭化亜鉛等が例示され、好ましくは塩化アンモニウム、酸化ジアルキルすず等が挙げられる。不活性溶媒としては、例えば水、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチル-2-ピロリドン、ジメチルスルホキシド、酢酸、氷酢酸、テトラヒドロフラン、ベンゼン、トルエン、キシレン等を単独でまたは混合して用いることができ、好ましくはジメチルホルムアミドまたはトルエンが用いられる。

化合物(I-c)から以下に示す方法によって化合物(I-i)を製造することができる。

#### 製造法7



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^{5b}$ 、 $R^{6b}$ 、 $R^8$ 、U、n、XおよびYはそれぞれ前記と同義であり、 $R^{18}$ は置換もしくは非置換の低級アルキルを表し、Qはアルカリ金属またはアルカリ土類金属を表し、Qがアルカリ金属の場合にはpは1を表し、Qがアルカリ土類金属の場合にはpは2を表す)

上記の定義においてアルカリ金属は前記アルカリ金属と同義であり、アルカリ土類金属としてはマグネシウム、カルシウム等が挙げられる。

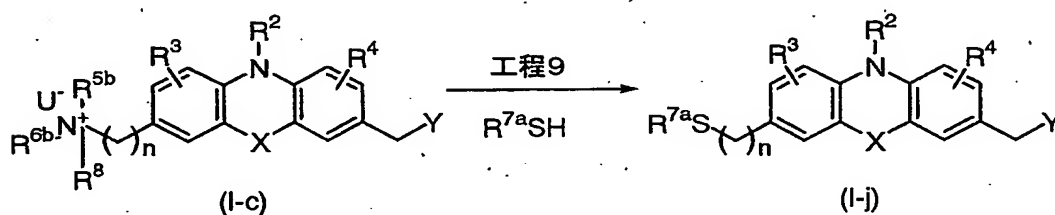
## &lt;工程 8&gt;

化合物(I-c)を不活性溶媒中、0℃から反応に用いた溶媒の沸点の間の温度、好ましくは70℃～80℃の間の温度で、1当量～大過剰、好ましくは4～8当量の $(R^{18}CO_2)_pQ$  (式中、 $R^{18}$ 、Qおよびpはそれぞれ前記と同義である)と、1～100時間、好ましくは3～72時間反応させることにより化合物(I-i)を得ることができる。

不活性溶媒としては、例えばジメチルアセトアミド、N-メチル-2-ピロリドン、ジメチルスルホキシド等を単独でまたは混合して用いることができ、好ましくはジメチルスルホキシドが用いられる。

化合物(I-c)から以下に示す方法によって化合物(I-j)を製造することができる。

## 製造法 8



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^{6b}$ 、 $R^{7a}$ 、 $R^8$ 、U、n、XおよびYはそれぞれ前記と同義である)

## &lt;工程 9&gt;

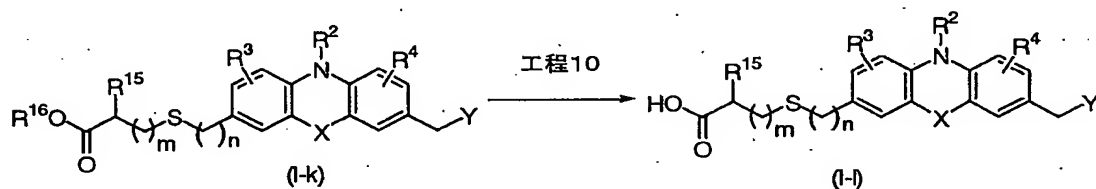
化合物(I-c)を不活性溶媒中、0℃から反応に用いた溶媒の沸点の間の温度、好ましくは30℃～80℃の間の温度で、1当量～大過剰、好ましくは2～8当量の $R^{7a}SH$  (式中、 $R^{7a}$ は前記と同義である)と、1当量～大過剰、好ましくは1～3当量の適当な塩基存在下、1～100時間、好ましくは3～72時間反応させることにより化合物(I-j)を得ることができる。

適当な塩基としては、例えばトリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、N-メチルモルホリン、炭酸カリウム、水素化ナトリウム、

水素化カリウム、水素化カルシウム、ジイソプロピルエチルアミン、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデック-7-エン等を用いることができ、中でも1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデック-7-エンが好ましい。不活性溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、ジクロロエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、ジメチルアセトアミド、N-メチル-2-ピロリドン、ジメチルスルホキシド等を単独でまたは混合して用いることができ、好ましくはクロロホルムが用いられる。

化合物(I-j)中、化合物(I-k)から以下に示す方法によって化合物(I-l)を製造することができる。

#### 製造法 9



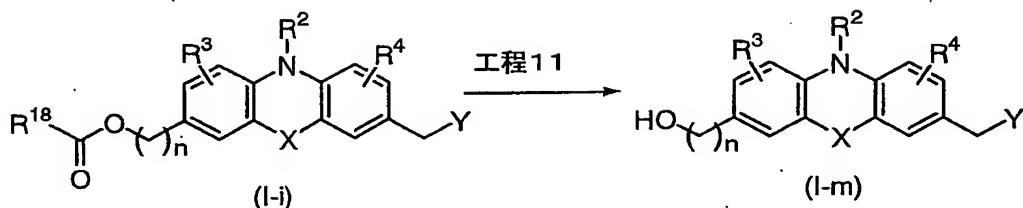
(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^{15}$ 、 $R^{16}$ 、 $m$ 、 $n$ 、 $X$ および $Y$ はそれぞれ前記と同義である)

#### <工程 10>

化合物(I-k)を用いて製造法5の工程6と同様な反応を行うことにより化合物(I-l)を製造することができる。

化合物(I-i)から以下に示す方法によって化合物(I-m)を製造することができる。

#### 製造法 10



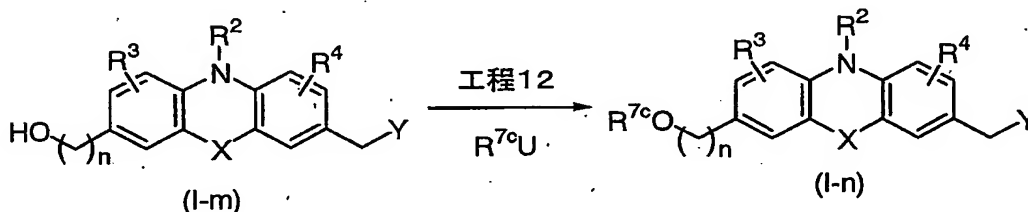
(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^{18}$ 、 $n$ 、 $X$ および $Y$ はそれぞれ前記と同義である)

#### <工程 1 1>

化合物 (I-i) を用いて製造法 5 の工程 6 と同様な反応を行うことにより化合物 (I-m) を製造することができる。

化合物 (I-m) から以下に示す方法によって化合物 (I-n) を製造することができる。

#### 製造法 1 1



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $U$ 、 $n$ 、 $X$ および $Y$ はそれぞれ前記と同義であり、 $R^{7c}$ は前記 $R^7$ の定義から水素を除いた基を表す)

#### <工程 1 2>

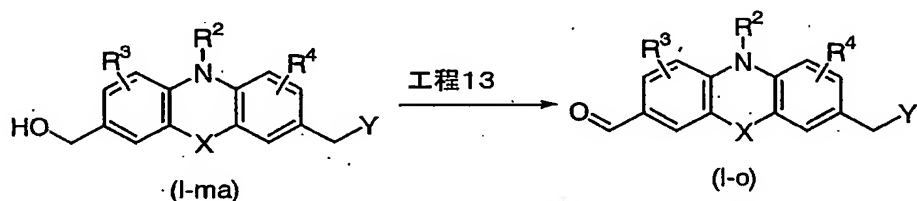
化合物 (I-m) を不活性溶媒中、 $0^\circ\text{C}$ から反応に用いた溶媒の沸点の間の温度、好ましくは室温から $80^\circ\text{C}$ の間の温度で、1当量～大過剰、好ましくは1～3当量の適当な塩基存在下、1当量～大過剰、好ましくは1～3当量の $R^{7c}U$  (式中、 $R^{7c}$ および $U$ はそれぞれ前記と同義である)と、1～48時間、好ましくは3～24時間反応させることにより化合物 (I-n) を得ることができる。

適当な塩基としては、例えば炭酸カリウム、水素化ナトリウム、水素化カ

リウム、水素化カルシウム、低級アルキルリチウム等が例示され、好ましくは、水素化ナトリウム、水素化カリウム等が挙げられる。不活性溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、ジクロロエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチル-2-ピロリドン、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル等を単独でまたは混合して用いることができ、好ましくはクロロホルムが用いられる。

化合物 (I-m) において  $n=1$  である化合物 (I-ma) から以下に示す方法によって化合物 (I-o) を製造することができる。

#### 製造法 12



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、XおよびYはそれぞれ前記と同義である)

#### <工程 13>

化合物 (I-ma) を不活性溶媒中、 $0^{\circ}\text{C}$  から反応に用いた溶媒の沸点の間の温度、好ましくは室温から  $60^{\circ}\text{C}$  の間の温度で、1当量～大過剰、好ましくは3～6当量の適当な酸化剤存在下、1～48時間、好ましくは3～24時間処理することにより化合物 (I-o) を得ることができる。

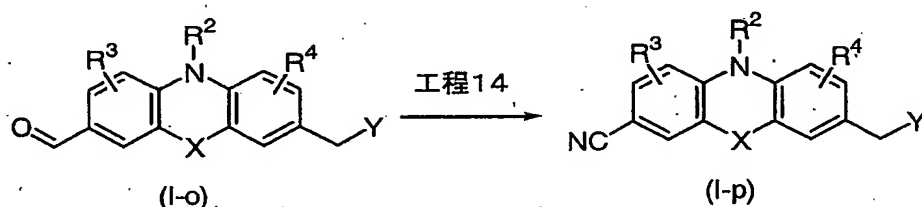
適当な酸化剤としては、例えば二酸化マンガン、クロム酸、クロロクロム酸ピリジニウム、二クロム酸ピリジニウム、過マンガン酸カリウム、三酸化硫黄-ピリジン、オキソン等が挙げられ、好ましくは二酸化マンガンが挙げられる。不活性溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、ジクロロエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、酢酸、プロピオン酸、酪酸、トリフルオロ酢酸、水、ピリジン、ジメチルホル



ムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチル-2-ピロリドン、1,4-ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル等を単独でまたは混合して用いることができ、好ましくはジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン等が用いられる。

化合物 (I-o) から以下に示す方法によって化合物 (I-p) を製造することができる。

#### 製造法 13



(式中、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、XおよびYはそれぞれ前記と同義である)

#### <工程 1.4>

化合物 (I-o) を不活性溶媒中、0°Cから反応に用いた溶媒の沸点の間の温度、好ましくは室温から90°Cの間の温度で、1当量～大過剰、好ましくは1～3当量のヒドロキシルアミンもしくはその塩酸塩、硫酸塩、パラトルエンスルホン酸塩等、0-フェニルカーバミルヒドロキシルアミンもしくはその塩酸塩、硫酸塩、パラトルエンスルホン酸塩等、またはN-ヒドロキシベンズアミド、好ましくはヒドロキシルアミンと、1～48時間、好ましくは3～24時間反応させることにより化合物 (I-p) を得ることができる。必要により、1当量～大過剰、好ましくは1～3当量の適当な脱水剤の添加や、1当量～大過剰、好ましくは2～6当量の適当な塩基の添加、またはマイクロ波照射を行ってもよい。

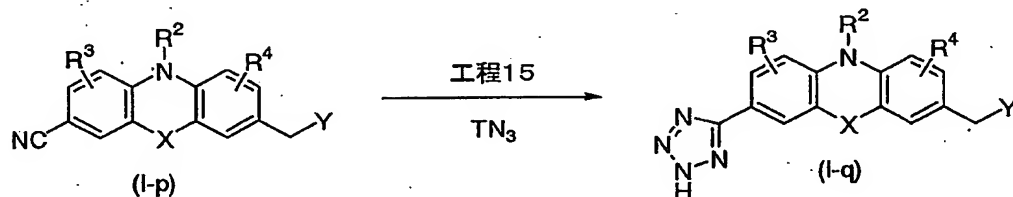
適当な脱水剤としては、例えば無水酢酸、無水フタル酸、硫酸水素ナトリウム、オキソン、ギ酸ナトリウム、酸化ジアルキルすず、アルミナ、シリカゲル、酢酸ナトリウム、ホルムアミド、五酸化ニリン、塩化鉄(III)、ギ酸、

酢酸、プロピオン酸、オキシ塩化リン、パラトルエンスルホン酸等が例示され、好ましくは無水酢酸、無水フタル酸等が挙げられる。適当な塩基としては、例えばトリエチルアミン、ピリジン、水素化ナトリウム、水素化カリウム等が例示され、好ましくはトリエチルアミンまたはピリジンが挙げられる。

不活性溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、ジクロロエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、ニトロベンゼン、アセトニトリル、酢酸エチル、酢酸、プロピオン酸、酪酸、トリフルオロ酢酸、ピリジン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチル-2-ピロリドン、1,4-ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、メタノール、エタノール、プロパノール等を単独でまたは混合して用いることができ、好ましくはアセトニトリル、ジメチルホルムアミド等が用いられる。

化合物 (I-p) から以下に示す方法によって化合物 (I-q) を製造することができる。

#### 製造法 14



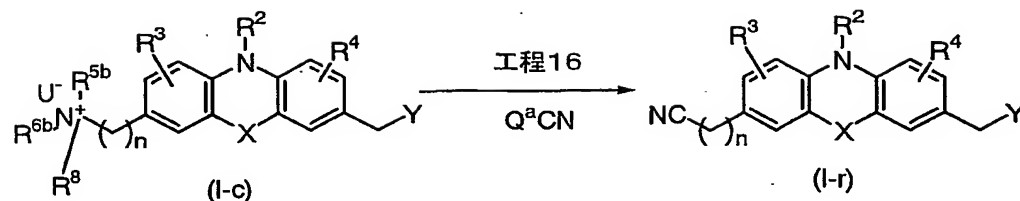
(式中、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、T、XおよびYはそれぞれ前記と同義である)

#### <工程 15>

化合物 (I-p) を用いて製造法 6 の工程 7 と同様な反応を行うことにより化合物 (I-q) を製造することができる。

化合物 (I-c) から以下に示す方法によって化合物 (I-r) を製造することができる。

#### 製造法 15



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^{6b}$ 、 $R^8$ 、 $U$ 、 $n$ 、 $X$ および $Y$ はそれぞれ前記と同義であり、 $Q^a$ は前記と同義のアルカリ金属を表す)

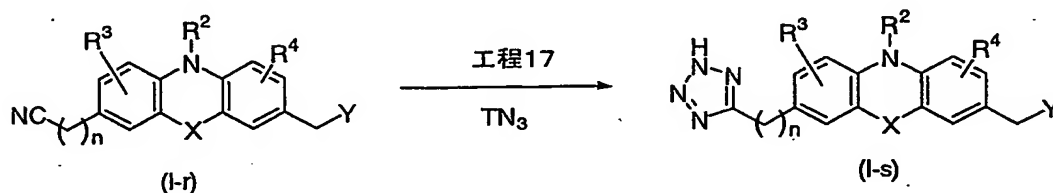
#### <工程 16>

化合物 (I-c) を不活性溶媒中、室温から反応に用いた溶媒の沸点の間の温度、好ましくは  $40^\circ\text{C}$  ~  $80^\circ\text{C}$  の間の温度で、1当量 ~ 大過剰、好ましくは 2 ~ 4当量の  $Q^a\text{CN}$  (式中、 $Q^a$ は前記と同義である)、好ましくは青酸ナトリウムと、1 ~ 48時間、好ましくは 3 ~ 24時間反応させることにより化合物 (I-r) を得ることができる。

不活性溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、ジクロロエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、 $N$ -メチル-2-ピロリドン、1,4-ジオキサン、テトラヒドロフラン等を単独でまたは混合して用いることができ、好ましくはジメチルホルムアミド等が用いられる。

化合物 (I-r) から以下に示す方法によって化合物 (I-s) を製造することができる。

#### 製造法 16



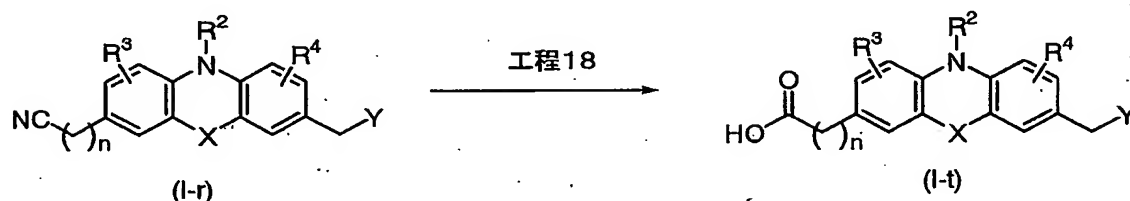
(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $T$ 、 $n$ 、 $X$ および $Y$ はそれぞれ前記と同義である)

<工程 17>

化合物 (I-r) を用いて製造法 6 の工程 7 と同様な反応を行うことにより化合物 (I-s) を製造することができる。

化合物 (I-r) から以下に示す方法によって化合物 (I-t) を製造することができる。

製造法 17



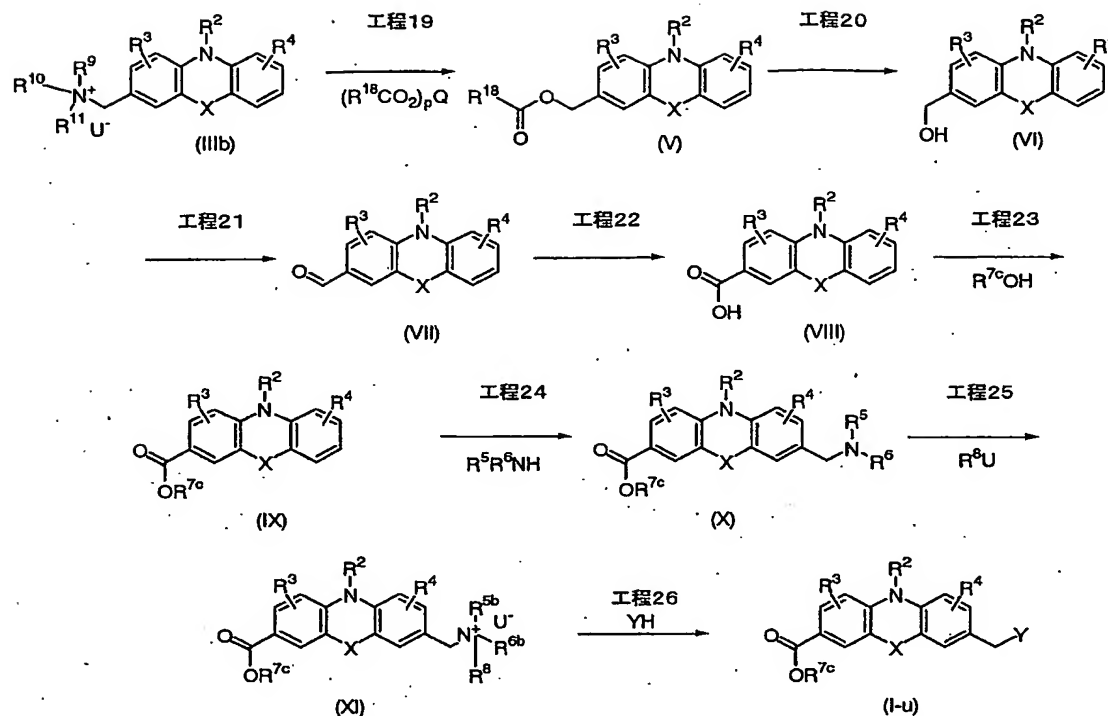
(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $n$ 、 $X$ および $Y$ はそれぞれ前記と同義である)

<工程 18>

化合物 (I-r) を用いて製造法 5 の工程 6 と同様な反応を行うことにより化合物 (I-t) を製造することができる。

化合物 (IIIb) から以下に示す方法によって化合物 (I-u) を製造することができる。

製造法 18



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^{5b}$ 、 $R^{6b}$ 、 $R^{7c}$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 、 $R^{18}$ 、 $Q$ 、 $p$ 、 $U$ 、 $X$ および $Y$ はそれぞれ前記と同義である)

#### <工程19>

化合物 (IIIb) を用いて製造法7の工程8と同様な反応を行うことにより化合物 (V) を製造することができる。

#### <工程20>

化合物 (V) を用いて製造法5の工程6と同様な反応を行うことにより化合物 (VI) を製造することができる。

#### <工程21>

化合物 (VI) を用いて製造法12の工程13と同様な反応を行うことにより化合物 (VII) を製造することができる。

#### <工程22>

化合物 (VII) を不活性溶媒中、通常 $0^\circ\text{C}$ ~ $80^\circ\text{C}$ の間の温度で、2~4当量の硝酸銀、酸化銀(I)、酸化銀(II)、クロム酸、クロロクロム酸ピリジニウ

ム、ニクロム酸ピリジニウム、過マンガン酸カリウム、過ヨウ素酸ナトリウム、過塩素酸ナトリウム、過酸化水素、亜塩素酸ナトリウム等の酸化剤、好ましくは硝酸銀または過塩素酸ナトリウム存在下で、10分間～24時間、好ましくは1～4時間処理することにより化合物(VIII)を製造することができる。必要により、添加剤として、0.1～4当量の酢酸等の有機物、または硫酸、リン酸二水素ナトリウム、スルファミン酸、酸化ルテミウム等の無機物を加えてもよい。

不活性溶媒としては、例えばジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド、ベンゼン、トルエン、キシレン、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、アセトニトリル、酢酸エチル、酢酸メチル、メチルエチルケトン、塩酸、酢酸、無水酢酸、硫酸、水等が挙げられ、好ましくはアセトニトリル、水等が挙げられ、これらは単独でまたは混合して用いることができる。

#### <工程 2 3>

化合物(VIII)を不活性溶媒中、通常0℃～80℃の間の温度、好ましくは室温で、1～20当量のハロゲン化剤と10分間～24時間反応させ、その後、1当量～大過剰の $R^7OH$ （式中、 $R^7$ は前記と同義である）と反応させることにより化合物(IX)を製造することができる。

ハロゲン化剤としては、例えば塩化チオニル、オキサリルクロリド、オキシ塩化リン等が挙げられ、好ましくは塩化チオニルが挙げられる。不活性溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、1,4-ジオキサン、アセトニトリル、ベンゼン、トルエン、キシレン等が挙げられ、これらは単独でまたは混合して用いることができる。不活性溶媒として好ましくはジクロロメタンが挙げられる。

#### <工程 2 4>

化合物(IX)を用いて製造法1の工程2と同様な反応を行うことにより化合物(X)を製造することができる。

#### <工程 2 5>

化合物 (X) を用いて製造法 2 の工程 3 と同様な反応を行うことにより化合物 (XI) を製造することができる。

<工程 26>

化合物 (XI) を用いて製造法 1 の工程 1 と同様な反応を行うことにより化合物 (I-u) を製造することができる。

化合物 (I-u) から以下に示す方法によって化合物 (I-v) を製造することができる。

製造法 19



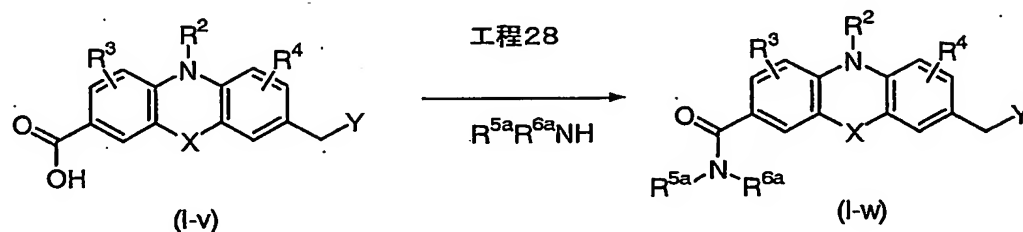
(式中、R¹、R³、R⁴、R⁷ᶜ、XおよびYはそれぞれ前記と同義である)

<工程 27>

化合物 (I-u) を用いて製造法 5 の工程 6 と同様な反応を行うことにより化合物 (I-v) を製造することができる。

化合物 (I-v) から以下に示す方法によって化合物 (I-w) を製造することができる。

製造法 20



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^{5a}$ 、 $R^{6a}$ 、XおよびYはそれぞれ前記と同義である)

#### <工程 28>

化合物(I-v)を不活性溶媒中、通常 $0^{\circ}\text{C}$ ~ $80^{\circ}\text{C}$ の間の温度、好ましくは室温で、1~20当量のハロゲン化剤と10分間~24時間反応させ、その後、1当量~大過剰の $R^{5a}R^{6a}\text{NH}$ (式中、 $R^{5a}$ および $R^{6a}$ はそれぞれ前記と同義である)と反応させることにより化合物(I-w)を製造することができる。必要に応じて、1当量~大過剰の適当な塩基を加えてもよい。

ハロゲン化剤としては、例えば塩化チオニル、オキサリルクロリド、オキシ塩化リン等が挙げられ、好ましくは塩化チオニルが挙げられる。適当な塩基としては、例えばピリジン、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、N-メチルモルホリン等が例示され、好ましくはトリエチルアミンが挙げられる。不活性溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、1,4-ジオキサン、アセトニトリル、ベンゼン、トルエン、キシレン等が挙げられ、これらを単独でまたは混合して用いることができる。不活性溶媒として好ましくはジクロロメタンが挙げられる。

化合物(I-w)の製造においては、ペプチド化学で常用される手法を用いることもできる。すなわち、化合物(I-v)に不活性溶媒中、0.5~10当量の適当な縮合剤と共に1~10当量の $R^{5a}R^{6a}\text{NH}$ (式中、 $R^{5a}$ および $R^{6a}$ はそれぞれ前記と同義である)を加え、通常、 $0^{\circ}\text{C}$ ~ $50^{\circ}\text{C}$ の間の温度で10分間~70時間反応させることにより化合物(I-w)を得ることができる。

不活性溶媒としては、例えばジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド、ベンゼン、トルエン、キシレン、アセトニトリル、酢酸エチル、ピリジン、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素等が挙げられ、好ましくはテトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド等が挙げられる。

適当な縮合剤としては、例えば1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド結合ポリスチレンレジン

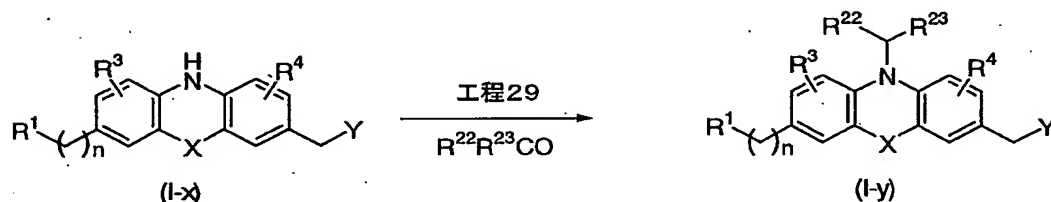


(EDCレジン)等が挙げられる。また、N-ヒドロキシコハク酸イミド、3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール等、好ましくは1-ヒドロキシベンゾトリアゾール等の添加剤を加えることもできる。

EDCレジン、テトラヘドロン レターズ (Tetrahedron Letters)、34巻、48号、7685頁 (1993年) 記載の方法で製造することができる。

化合物 (I) 中、化合物 (I-x) から、以下に示す方法によって化合物 (I-y) を製造することができる。

#### 製造法 2 1



(式中、 $R^1$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $n$ 、 $X$ および $Y$ はそれぞれ前記と同義であり、 $R^{22}$ および $R^{23}$ は同一または異なって水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表す)

上記の定義において低級アルキル、シクロアルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、アラルキル、および複素環アルキルはそれぞれ前記と同義であり、それらの置換基もそれぞれ前記と同義である。

#### <工程 2 9>

化合物 (I-x) を不活性溶媒中、1当量～大過剰の、好ましくは1～10当量の $R^{22}R^{23}CO$  (式中、 $R^{22}$ および $R^{23}$ はそれぞれ前記と同義である) と、1当量～大過剰、好ましくは1～3当量の適当な還元剤の存在下、通常  $-78^{\circ}\text{C}$ ～ $100^{\circ}\text{C}$  の間の温度、好ましくは $0^{\circ}\text{C}$ ～ $50^{\circ}\text{C}$  の間の温度で10分間～48時間反応させるこ

とにより化合物(I-y)を得ることができる。

適当な還元剤としては、例えば水素化ホウ素ナトリウム、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウム等が挙げられ、好ましくはシアノ水素化ホウ素ナトリウムが挙げられる。必要により、触媒量～溶媒量、好ましくは0.5当量～溶媒量の適当な酸を添加してもよい。適当な酸としては、例えばギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、プロピオン酸、塩酸等が挙げられ、好ましくは酢酸が挙げられる。

不活性溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、ジクロロエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、アセトニトリル、ヘキサン、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、プロピオン酸、塩酸等が例示され、これらを単独でまたは混合して用いることができる。好ましくは、テトラヒドロフラン、酢酸等が挙げられる。

化合物(I)および原料化合物における各官能基の変換および置換基に含まれる官能基の変換は、公知の方法〔例えば、コンプリヘンシブ・オーガニック・トランスフォーメーションズ 第二版(Comprehensive Organic Transformations, the second edition)、R.C.ラロック(Larock)著、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ・インコーポレーティッド(John Wiley & Sons Inc.) (1999年)に記載の方法〕等によって行うことができる。

上記の方法等を適宜組み合わせて実施することにより、所望の位置に所望の官能基を有する化合物(I)を得ることができる。

上記製造法における中間体および生成物の単離・精製は、通常の有機合成で用いられる方法、例えば濾過、抽出、洗浄、乾燥、濃縮、結晶化、各種クロマトグラフィー等を適宜組み合わせて行うことができる。さらに一般的な並列合成法で常用される精製法、例えば、スカベンジャーレジン、イオン交換レジンを用いた精製法によっても行うことができる。また、中間体においては、特に精製することなく次の反応に供することもできる。

化合物(I)には、位置異性体、幾何異性体、光学異性体または互変異性体のような異性体が存在し得るものもあるが、これらを含め可能な全ての異性

体および該異性体のいかなる比率における混合物も本発明の好中球性炎症疾患の予防および／または治療薬に使用することができる。

化合物(I)の塩を取得したい場合には、化合物(I)の塩が得られるときはそのまま精製すればよく、また化合物(I)が遊離の形で得られるときは化合物(I)を適当な溶媒に溶解または懸濁し、酸または塩基を加えて単離・精製すればよい。

また、化合物(I)またはその薬理学的に許容される塩は、水または各種溶媒との付加物の形で存在することもあるが、これらの付加物も本発明に包含される。

以下、第1表～第13表に本発明の好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤として用いられる化合物(I)の具体例を示すが、本発明の好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤として用いられる化合物範囲はこれらの化合物に限定されることはない。

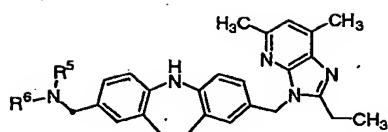
また、化合物(II)の一部が、好中球炎症性疾患の予防および／または治療薬以外の用途を有する化合物として知られている[特開2002-30085号、特開2001-39874号、特開平11-255750号、WO98/6,720、特開平7-165689号、WO95/2,596、特開平6-73047号、FR2,693,197、WO94/450、EP569,013、EP546,449、EP533,058、EP543,491、EP514,197、WO94/22,859、US5,332,820、WO00/1,389、WO94/12,500、WO91/11,999、DE4,313,747、WO93/24,487、EP400,974、EP399,731、特開平6-73051号、特開平6-360874号、EP560,330、US5,151,435、EP520,724、EP520,723、EP450,566、EP429,257、US5,734,615、US5,208,235、EP488,532]。

化合物(II)は、上記の公報等に記載の製造方法によりまたはそれらに準じて製造することが可能であり、化合物(II)の四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩も、化合物(I)の場合と同様にして製造することが可能である。

好中球性炎症疾患治療剤のスクリーニング法に用いる動物は特に限定されないが、例えばヒトを除く哺乳類動物等が挙げられる。気管支肺胞中の好中球浸潤を誘発する物質としては、特に限定されないが、SPC等が挙げられ

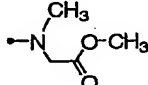
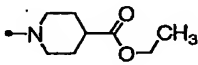
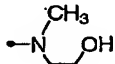
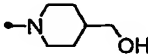
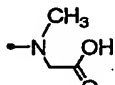
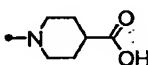
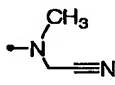
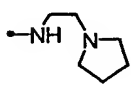
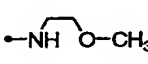
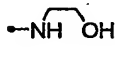

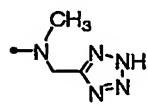
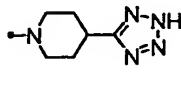
る。

第1表

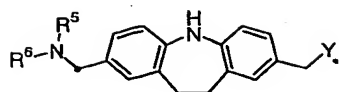


| 化合物<br>番号 | $\text{---NR}^5\text{R}^6$ |
|-----------|----------------------------|
| 1         |                            |
| 2         |                            |
| 3         |                            |
| 4         |                            |
| 5         |                            |
| 6         |                            |
| 7         |                            |
| 8         |                            |
| 9         |                            |
| 10        |                            |
| 11        |                            |
| 12        |                            |
| 13        |                            |
| 14        |                            |

第1表 (続き)

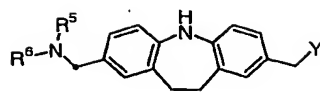
| 化合物<br>番号 | $\bullet\text{-NR}^5\text{R}^6$   |
|-----------|---|
| 15        |    |
| 16        |    |
| 17        |    |
| 18        |    |
| 19        |    |
| 20        |   |
| 21        |  |
| 22        |  |
| 23        |  |
| 24        |  |
| 25        |  |
| 26        |  |
| 27        |  |

第2表



| 化合物<br>番号 | $\text{—NR}^5\text{R}^6$ | $\text{—Y}$ | 質量分析値                         |
|-----------|--------------------------|-------------|-------------------------------|
| 28        |                          |             | MS m/z 438 (M+H) <sup>+</sup> |
| 29        |                          |             | MS m/z 421 (M+H) <sup>+</sup> |
| 30        |                          |             | MS m/z 409 (M+H) <sup>+</sup> |
| 31        |                          |             | MS m/z 451 (M+H) <sup>+</sup> |
| 32        |                          |             | MS m/z 506 (M+H) <sup>+</sup> |
| 33        |                          |             | MS m/z 513 (M+H) <sup>+</sup> |
| 34        |                          |             | MS m/z 514 (M+H) <sup>+</sup> |
| 35        |                          |             | MS m/z 496 (M+H) <sup>+</sup> |
| 36        |                          |             | MS m/z 425 (M+H) <sup>+</sup> |
| 37        |                          |             | MS m/z 427 (M+H) <sup>+</sup> |
| 38        |                          |             | MS m/z 425 (M+H) <sup>+</sup> |
| 39        |                          |             | MS m/z 471 (M+H) <sup>+</sup> |

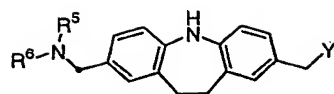
第3表



| 化合物<br>番号 | $\text{—NR}^5\text{R}^6$ | $\text{—Y}$ | 質量分析値                         |
|-----------|--------------------------|-------------|-------------------------------|
| 40        |                          |             | MS m/z 514 (M+H) <sup>+</sup> |
| 41        |                          |             | MS m/z 497 (M+H) <sup>+</sup> |
| 42        |                          |             | MS m/z 485 (M+H) <sup>+</sup> |
| 43        |                          |             | MS m/z 527 (M+H) <sup>+</sup> |
| 44        |                          |             | MS m/z 582 (M+H) <sup>+</sup> |
| 45        |                          |             | MS m/z 589 (M+H) <sup>+</sup> |
| 46        |                          |             | MS m/z 590 (M+H) <sup>+</sup> |
| 47        |                          |             | MS m/z 572 (M+H) <sup>+</sup> |
| 48        |                          |             | MS m/z 501 (M+H) <sup>+</sup> |
| 49        |                          |             | MS m/z 503 (M+H) <sup>+</sup> |
| 50        |                          |             | MS m/z 501 (M+H) <sup>+</sup> |
| 51        |                          |             | MS m/z 547 (M+H) <sup>+</sup> |

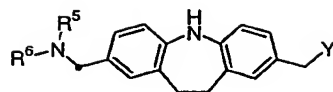


第4表



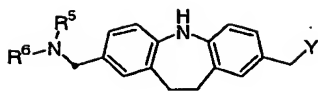
| 化合物<br>番号 | $\bullet\text{-NR}^5\text{R}^6$ | $\bullet\text{-Y}$ | 質量分析値                         |
|-----------|---------------------------------|--------------------|-------------------------------|
| 52        |                                 |                    | MS m/z 452 (M+H) <sup>+</sup> |
| 53        |                                 |                    | MS m/z 435 (M+H) <sup>+</sup> |
| 54        |                                 |                    | MS m/z 423 (M+H) <sup>+</sup> |
| 55        |                                 |                    | MS m/z 465 (M+H) <sup>+</sup> |
| 56        |                                 |                    | MS m/z 520 (M+H) <sup>+</sup> |
| 57        |                                 |                    | MS m/z 527 (M+H) <sup>+</sup> |
| 58        |                                 |                    | MS m/z 528 (M+H) <sup>+</sup> |
| 59        |                                 |                    | MS m/z 510 (M+H) <sup>+</sup> |
| 60        |                                 |                    | MS m/z 439 (M+H) <sup>+</sup> |
| 61        |                                 |                    | MS m/z 441 (M+H) <sup>+</sup> |
| 62        |                                 |                    | MS m/z 439 (M+H) <sup>+</sup> |
| 63        |                                 |                    | MS m/z 485 (M+H) <sup>+</sup> |

第5表



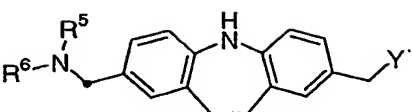

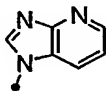

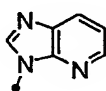

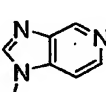
| 化合物<br>番号 | $\bullet\text{-NR}^5\text{R}^6$ | $\bullet\text{-Y}$ | 質量分析値                         |
|-----------|---------------------------------|--------------------|-------------------------------|
| 64        |                                 |                    | MS m/z 466 (M+H) <sup>+</sup> |
| 65        |                                 |                    | MS m/z 449 (M+H) <sup>+</sup> |
| 66        |                                 |                    | MS m/z 437 (M+H) <sup>+</sup> |
| 67        |                                 |                    | MS m/z 479 (M+H) <sup>+</sup> |
| 68        |                                 |                    | MS m/z 534 (M+H) <sup>+</sup> |
| 69        |                                 |                    | MS m/z 541 (M+H) <sup>+</sup> |
| 70        |                                 |                    | MS m/z 542 (M+H) <sup>+</sup> |
| 71        |                                 |                    | MS m/z 524 (M+H) <sup>+</sup> |
| 72        |                                 |                    | MS m/z 453 (M+H) <sup>+</sup> |
| 73        |                                 |                    | MS m/z 455 (M+H) <sup>+</sup> |
| 74        |                                 |                    | MS m/z 453 (M+H) <sup>+</sup> |
| 75        |                                 |                    | MS m/z 499 (M+H) <sup>+</sup> |

第6表



| 化合物<br>番号 | $\text{---NR}^5\text{R}^6$ | $\text{---Y}$ | 質量分析値                         |
|-----------|----------------------------|---------------|-------------------------------|
| 76        |                            |               | MS m/z 466 (M+H) <sup>+</sup> |
| 77        |                            |               | MS m/z 449 (M+H) <sup>+</sup> |
| 78        |                            |               | MS m/z 437 (M+H) <sup>+</sup> |
| 79        |                            |               | MS m/z 479 (M+H) <sup>+</sup> |
| 80        |                            |               | MS m/z 534 (M+H) <sup>+</sup> |
| 81        |                            |               | MS m/z 541 (M+H) <sup>+</sup> |
| 82        |                            |               | MS m/z 542 (M+H) <sup>+</sup> |
| 83        |                            |               | MS m/z 524 (M+H) <sup>+</sup> |
| 84        |                            |               | MS m/z 453 (M+H) <sup>+</sup> |
| 85        |                            |               | MS m/z 455 (M+H) <sup>+</sup> |
| 86        |                            |               | MS m/z 453 (M+H) <sup>+</sup> |
| 87        |                            |               | MS m/z 499 (M+H) <sup>+</sup> |

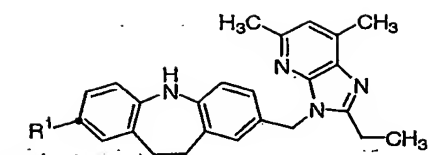
第7表

|  |   |  |
|--|---|--|
| 化合物<br>番号  | $\bullet\text{-NR}^5\text{R}^6$   | $\bullet\text{-Y}$   |
| 88   |  |  |
| 89   |  |  |
| 90   |  |  |

第8表

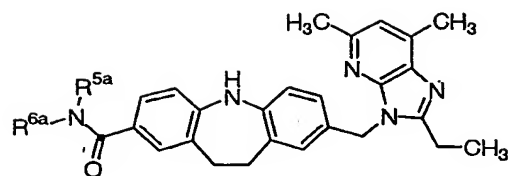
| 化合物<br>番号 | -OR <sup>7</sup> |
|-----------|------------------|
| 92        |                  |
| 93        |                  |
| 94        |                  |
| 95        |                  |
| 96        |                  |
| 97        |                  |
| 98        |                  |
| 99        |                  |
| 100       |                  |
| 101       |                  |
| 102       |                  |

第9表




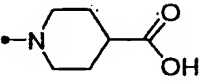
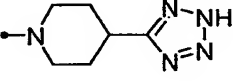
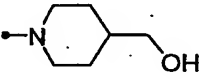
| 化合物<br>番号 | •R¹ |
|-----------|-----|
| 103       |     |
| 104       |     |
| 105       |     |
| 106       |     |
| 107       |     |
| 108       |     |
| 109       |     |
| 110       |     |
| 111       |     |

第10表



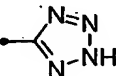
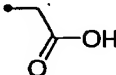
| 化合物<br>番号 | ●—NR <sup>5a</sup> R <sup>6a</sup> |
|-----------|------------------------------------|
| 112       |                                    |
| 113       |                                    |
| 114       |                                    |
| 115       |                                    |
| 116       |                                    |
| 117       |                                    |
| 118       |                                    |
| 119       | ●—NH <sub>2</sub>                  |

第11表

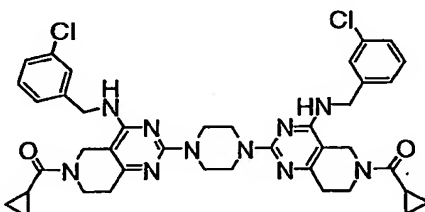
| 化合物<br>番号 | ●-NR <sup>5</sup> R <sup>6</sup>   |
|-----------|--|
| 120       |     |
| 121       |   |
| 122       |  |
| 123       |  |



第12表

| 化合物<br>番号 | R <sup>1</sup>  |
|-----------|---|
| 124       |  |
| 125       |  |

第13表

| 化合物<br>番号 |  |
|-----------|--|
| 91        |  |

第14表

| 化合物<br>番号 | 質量分析値                         |
|-----------|-------------------------------|
| 5         | MS m/z 508 (M+H) <sup>+</sup> |
| 6         | MS m/z 563 (M+H) <sup>+</sup> |
| 7         | MS m/z 570 (M+H) <sup>+</sup> |
| 8         | MS m/z 571 (M+H) <sup>+</sup> |
| 9         | MS m/z 553 (M+H) <sup>+</sup> |
| 10        | MS m/z 484 (M+H) <sup>+</sup> |
| 11        | MS m/z 482 (M+H) <sup>+</sup> |
| 12        | MS m/z 528 (M+H) <sup>+</sup> |

図面の簡単な説明

第1図は化合物1のリボポリサッカライドW B.coli 055:B5（シグマ・アルドリッチ社製、以下、LPSと略す）誘発気道内好中球浸潤に対する抑制作用を示す。第1図において符号（##、\*\*）は各々下記の意味を表す。

##：p=0.0021（陽性対照群の陰性対照群対比；Student's t-test）

\*\*：p=0.087（化合物1投与群の陽性対照群対比；Student's t-test）

第2図は化合物1のLPS誘発TNF- $\alpha$ 産生に対する抑制作用を示す。第2図において符号（##、\*）は各々下記の意味を表す。

##：p=0.0057（陽性対照群の陰性対照群対比；Student's t-test）

\*：p=0.0410（化合物1投与群の陽性対照群対比；Student's t-test）

第3図は化合物1のSPC誘発気道内好中球浸潤に対する抑制作用を示す。第3図において符号（###、\*）は各々下記の意味を表す。

### :  $p < 0.0001$  (陽性対照群の陰性対照群対比 ; Student' s t-test)

\* :  $p = 0.01668$  (化合物 1 投与群の陽性対照群対比 ; Steel test)

第 4 図は化合物 1 の LPC 誘発気道内好中球浸潤に対する抑制作用を示す。  
第 4 図において符号 (##、\*\*) は各々下記の意味を表す。

## :  $p = 0.0015$  (陽性対照群の陰性対照群対比 ; Aspin-welch test)

\*\* :  $p = 0.0031$  (化合物 1 投与群の陽性対照群対比 ; Student' s t-test)

第 5 図は化合物 18 の LPC 誘発気道内好中球浸潤に対する抑制作用を示す。  
第 5 図において符号 (##、\*\*\*) は各々下記の意味を表す。

## :  $p = 0.0028$  (陽性対照群の陰性対照群対比 ; Aspin-welch test)

\*\*\* :  $p = 0.0007$  (化合物 18 投与群の陽性対照群対比 ; Student' s t-test)

第 6 図は化合物 1 の LPC 誘発気道内 KC 産生に対する抑制作用を示す。第 6 図において符号 (###、\*\*) は各々下記の意味を表す。

### :  $p < 0.0001$  (陽性対照群の陰性対照群対比 ; Aspin-welch test)

\*\* :  $p = 0.0013$  (化合物 1 投与群の陽性対照群対比 ; Student' s t-test)

第 7 図は化合物 1 の LPC 誘発気道内 MIP-2 産生に対する抑制作用を示す。第 7 図において符号 (###、\*\*) は各々下記の意味を表す。

### :  $p = 0.0002$  (陽性対照群の陰性対照群対比 ; Student' s t-test)

\*\* :  $p = 0.0040$  (化合物 1 投与群の陽性対照群対比 ; Student' s t-test)

第 8 図は LPS 誘発肺障害モデルの気道内浸潤細胞における GPR4 mRNA の発現を示す。

第 9 図は SPC 誘発気道内浸潤細胞における GPR4 mRNA の発現を示す。

次に化合物の薬理作用について試験例で説明する。

試験例 1 : GPR4 拮抗作用

参考例61で得られたGPR4のアッセイ細胞（該アッセイ細胞は $17\beta$ -エストラジオール（ $17\beta$ -estradiol、シグマ社製）の刺激によりGPR4を発現する）を白色プレートに1ウェル当たり $10^5$ 個播種し、反応液中10 nmol/Lになるように $17\beta$ -エストラジオール（ $17\beta$ -estradiol、シグマ社製）を培地で希釈したものと試験化合物1  $\mu$ mol/Lを加え、37°C、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で6時間反応させた。その後、Steady-Glo Luciferase Assay System（Promega社製）溶液を加えて反応を停止し、トップカウント（Packard, Meriden, CT, USA）で1秒間の発光量を測定した。

試験化合物の活性（拮抗作用）は、下の式に示す通り $17\beta$ -エストラジオール添加時と非添加時のカウント数（count per second）をもとに算出した阻害率で表した。

式中、A、B、Cはそれぞれ以下の意味を表す。

A :  $17\beta$ -エストラジオールおよび試験化合物を添加時のカウント数  
 B :  $17\beta$ -エストラジオールおよび試験化合物の両方とも非添加時のカウント数  
 C :  $17\beta$ -エストラジオールのみ添加時のカウント数

$$\text{阻害率 (\%)} = [1 - \{(A - B) / (C - B)\}] \times 100$$

結果を第15表に示す。

第15表

| 化合物番号 | 阻害率(%) |
|-------|--------|
| 1     | 89     |
| 2     | 97     |
| 3     | 96     |
| 4     | 96     |
| 5     | 85     |
| 18    | 96     |

以上の結果より、化合物(I)が、GPR4に拮抗することが示された。

### 試験例2：LPS誘発肺障害モデルに対する抑制作用

BALB/c系マウス（雄性、7週齢、日本チャールス・リバー）に生理食塩水に溶解したLPS(30 ng/mL)もしくは生理食塩水(陰性対照群) 0.1 mLを気管内投与して、6時間後に肺胞洗浄を行い、回収した気管支肺胞洗浄液(BALF)中の好中球数およびTNF- $\alpha$ 濃度を測定した。メチルセルロースを0.5%含む水溶液(溶媒)に化合物1を懸濁し、LPS投与1時間前に100 mg/kgを経口投与した。また陽性対照群には化合物1懸濁液の代わりに溶媒を投与した。好中球数は回収したBALF中から塗沫標本をCytospin3 (Shandon, Inc., Pittsburgh, PA, USA)で作製し、ライト染色後、顕微鏡下で計数した。また、BALF中のTNF- $\alpha$ 濃度はエンザイムイムノアッセイキット(R&D systems, MN, USA)を用いて測定した。試験は1群7匹で行った。

好中球数計数の結果を第1図、TNF- $\alpha$ 濃度測定の結果を第2図に示す。

第1図に示すように、陰性対照群のBALF中好中球数は、一個体あたり( $0.12 \pm 0.1$ )  $\times 10^4$ 個(平均値 $\pm$ 標準誤差)であり、陽性対照群では、( $16.14 \pm 4.90$ )  $\times 10^4$ 個と好中球数の顕著な増加が認められた。化合物1投与群では、好中球数( $9.59 \pm 2.4$ )  $\times 10^4$ 個であり、陽性対照群と比べ好中球数の増加が41%抑制された。

第2図に示すように、陰性対照群のBALF中TNF- $\alpha$ 濃度は、 $118 \pm 25$  pg/mL(平均値 $\pm$ 標準誤差)であり、陽性対照群では、 $3521 \pm 810$  pg/mLとTNF- $\alpha$ 濃度の顕著な増加が認められた。化合物1投与群では、TNF- $\alpha$ 濃度 $1418 \pm 179$  pg/mLであり、陽性対照群と比べTNF- $\alpha$ 濃度の上昇が62%抑制された。

本モデルは、ARDSの評価モデルとしても汎用されている[チェスト(Chest)、Apr;105(4)、p1241-5 (1994年)]。上記のように、化合物1が本モデルにおいて効果があることが示され、化合物(I)がARDSに対しても有効であると考えられる。

### 試験例3：SPC誘発気道内好中球浸潤に対する抑制作用

BALB/c系マウス（雄性、7週齢、日本チャールス・リバー）に0.1%牛血清アルブミン加リン酸緩衝液に溶解した1 mg/mL SPC溶液もしくは0.1%牛血清アルブミン加リン酸緩衝液(陰性対照群) 0.1 mLを気管内投与して、6時間後

に肺胞洗浄を行い、回収したBALF中の好中球浸潤を評価した。メチルセルロースを0.5%含む水溶液(溶媒)に化合物1を懸濁し、SPC投与1時間前に100 mg/kgを経口投与した。また陽性対照群には化合物1懸濁液の代わりに溶媒を投与した。好中球の浸潤は、回収したBALF中の総細胞数を自動血球数測定装置(Celltac  $\alpha$  MEK-6158; 日本光電、東京)で測定した後、塗沫標本をCytospin3 (Shandon, Inc., Pittsburgh, PA, USA)で作製し、顕微鏡下、形態学的に好中球に分類して評価した。好中球数は総細胞数に好中球の百分率を乗じて算出した。試験は、陰性対照群では7匹、陽性対照群では5匹、化合物1投与群では6匹で実施した。

結果を第3図に示す。

陰性対照群のBALF中好中球数は、一個体あたり $(0.31 \pm 0.07) \times 10^5$ 個(平均値 $\pm$ 標準誤差)であり、陽性対照群では、 $(1.66 \pm 0.18) \times 10^5$ 個と好中球数の顕著な増加が認められた。化合物1投与群では、好中球数1個体あたり $(0.20 \pm 0.02) \times 10^5$ 個であった。陽性対照群と比べ、化合物1投与群では好中球数の増加が109%抑制された。

#### 試験例4: LPC誘発気道内好中球浸潤に対する抑制作用

BALB/c系マウス(雄性、7週齢、日本チャールス・リバー)に0.1%牛血清アルブミン加リン酸緩衝液に溶解した1 mg/mL LPC溶液もしくは0.1%牛血清アルブミン加リン酸緩衝液(陰性対照群) 0.1 mLを気管内投与して、6時間後に肺胞洗浄を行い、回収したBALF中の好中球浸潤を評価した。メチルセルロースを0.5%含む水溶液(溶媒)に化合物1および化合物18を懸濁し、LPC投与1時間前に10 mg/kgを経口投与した。また陽性対照群には化合物1懸濁液の代わりに溶媒を投与した。好中球の浸潤は、回収したBALF中の総細胞数を自動血球数測定装置(Celltac  $\alpha$  MEK-6158; 日本光電、東京)で測定した後、塗沫標本をCytospin 3 (Shandon, Inc., Pittsburgh, PA, USA)で作製し、顕微鏡下に好中球数をカウントした。好中球数は総細胞数に好中球の百分率を乗じて算出した。試験は、一群6匹で実施した。

化合物1の結果を第4図に、化合物18の結果を第5図に示す。

第4図に示すように、陰性対照群のBALF中好中球数は、一個体あたり $(0.13$

$\pm 0.07) \times 10^5$ 個 (平均値 $\pm$ 標準誤差) であり、陽性対照群では、 $(1.55 \pm 0.24) \times 10^5$ 個と好中球数の顕著な増加が認められた。化合物1投与群では、好中球数一個体あたり $(0.57 \pm 0.09) \times 10^5$ 個であった。陽性対照群と比べ、化合物1投与群では好中球数の増加が71% 抑制された。

第5図に示すように、陰性対照群のBALF中好中球数は、一個体あたり $(0.13 \pm 0.06) \times 10^5$ 個 (平均値 $\pm$ 標準誤差) であり、陽性対照群では、 $(2.80 \pm 0.42) \times 10^5$ 個と好中球数の顕著な増加が認められた。化合物18投与群では、好中球数一個体あたり $(0.72 \pm 0.14) \times 10^5$ 個であった。陽性対照群と比べ、化合物18投与群では好中球数の増加が78% 抑制された。

#### 試験例5：LPC誘発気道内KCおよびMIP-2産生に対する抑制作用

BALB/c系マウス (雄性、7週齢、日本チャールス・リバー) に0.1%牛血清アルブミン加リン酸緩衝液に溶解した1 mg/mL LPC溶液もしくは0.1%牛血清アルブミン加リン酸緩衝液 (陰性対照群) 0.1 mLを気管内投与して、3時間後に肺胞洗浄を行い、回収したBALF上清中のKCおよびMIP-2を評価した。メチルセルロースを0.5%含む水溶液 (溶媒) に化合物1を懸濁し、LPC投与1時間前に10 mg/kgを経口投与した。また陽性対照群には化合物1懸濁液の代わりに溶媒を投与した。好中球を遊走させるKC (keratinocyte-derived chemokine、ケラチノサイト由来ケモカイン) およびMIP-2

(macrophage-inflammation protein-2、マクロファージ炎症性蛋白質-2) は、回収したBALF上清を回収し、ELISA kit (DuoSet, R&D Systems) で定法に従い測定した。試験は、一群6匹で実施した。

結果を第6図、第7図に示す。

陰性対照群のBALF上清中KC、MIP-2は、一個体あたりそれぞれ $0.04 \pm 0.02$  ng/mL、 $0.06 \pm 0.02$  ng/mL (平均値 $\pm$ 標準誤差) であり、陽性対照群では、それぞれ $1.75 \pm 0.11$  ng/mL、 $1.38 \pm 0.11$  ng/mLといずれも有意な増加が認められた。化合物1投与群では、一個体あたりそれぞれ $0.80 \pm 0.14$  ng/mL、 $0.71 \pm 0.11$  ng/mLであった。陽性対照群と比べ、化合物1投与群ではKC、MIP-2の産生がそれぞれ56%、51% 抑制された。

## 試験例6：LPS誘発肺障害モデルの気道内浸潤細胞におけるGPR4 mRNAの発現解析

BALF中の浸潤細胞におけるGPR4の発現解析は、リアルタイムモニタリングによる定量的polymerase chain reaction (PCR)法(TaqMan法)により行った。本法はTaqMan プローブと呼ばれる両端に蛍光色素を持つプローブにより標的PCRプロダクト量に比例する蛍光発光量を検出し、標的核酸配列を定量する原理に基づいている。

なお、以下の遺伝子実験操作はモレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)第2版に記載されている方法で行った。

### (1) TaqMan プローブおよびプライマーの設定

TaqMan プローブおよびプライマーは、Primer Express™ Version 1.5 (Applied Biosystems社製ソフトウェア)を用いて設計し合成した。TaqMan プローブとしてはマウスGPR4をコードするDNA(配列番号14)の塩基番号577-601番目(配列番号19)の塩基配列に一致するプローブを合成した(サワディーテクノロジー社)。プライマーとしては、マウスGPR4をコードするDNA(配列番号14)の塩基番号549-570番目(センス鎖、配列番号20)および604-622番目(アンチセンス鎖、配列番号21)の塩基配列に相当するプライマーを設定し合成した(インビトロジェン社)。内部標準としてglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(G3PDH)を用いた。G3PDHの配列はG3PDH遺伝子の配列情報(GenBank受入番号：M32599)を用いた。TaqManプローブとしてはマウスG3PDHをコードするDNAの塩基番号784-813番目(配列番号22)の塩基配列に一致するプローブを合成した(サワディーテクノロジー社)。プライマーとしてはマウスG3PDHの塩基番号756-776番目(センス鎖、配列番号23)および塩基番号816-836番目(アンチセンス鎖、配列番号24)の塩基配列に相当するプライマーを設定し合成した(インビトロジェン社)。またG3PDHについてはスタンダード用プラスミドを作製するためにマウスG3PDHの塩基番号257-278番目(配列番号25)の塩基配列に相当するプライマーを設定し合成した(インビトロジェン社)。

### (2) TaqMan PCR 検量線作成用プラスミドの作製

マウスGPR4は、マウス肺cDNAを鋳型とし、配列番号20および配列番号21



で表される塩基配列からなるDNAをプライマーに用いたPCRによって取得した。該PCRは、上記cDNA 1  $\mu$ L、0.25  $\mu$ mol/Lの各プライマー、200  $\mu$ mol/Lの各dNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、Ampli Taq Gold (Applied Biosystems社) 0.2  $\mu$ Lおよび10 X PCRバッファー (酵素に添付) 4  $\mu$ Lを含む40  $\mu$ Lの反応液を用いて行った。サーマルサイクラーPTC-200 (MJ RESEARCH社)を用い、95°Cで10分間加熱後、94°Cで1分間、55°Cで1分間、72°Cで1分間のサイクルを30回行い、最後に72°Cで5分間の処理を行った。該PCR産物をアガロースゲル電気泳動し、断片を精製した。精製した断片はDNA結合反応によりpT7Blue T-vector (Novagen社)にサブクローニングした。PCR増幅断片とpT7Blue T-vector 50 ngを加えてDNA結合反応を行い、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、プラスミドpT7mrGPR4を得た。核酸配列の確認はABI377自動シーケンサー (Applied Biosystems社)を用いて行い、マウスGPR4の部分配列 (配列番号26) を得た。内部標準に用いるマウスG3PDHは、マウス耳由来のcDNAを鋳型とし、プライマー (配列番号25) およびプライマー (配列番号24) を用いてPCRを行うことにより取得した。該PCR反応は、上記cDNA 1  $\mu$ L、0.2  $\mu$ mol/Lの各プライマー、200  $\mu$ mol/Lの各dNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、Advantage 2 polymerase mix (Clontech社) 0.2  $\mu$ Lおよび10 X PCRバッファー (Clontech社) を含む50  $\mu$ Lの反応液を用いて行った。サーマルサイクラーPTC-200 (MJ RESEARCH社)を用い、95°Cで2分間加熱後、94°Cで15秒間、60°Cで1分間のサイクルを30回行い、最後に72°Cで5分間の処理を行った。該PCR産物をアガロースゲル電気泳動し、断片を精製した。精製した断片はDNA結合反応によりpT7Blue T-vector (Novagen社)にサブクローニングした。PCR増幅断片とpT7Blue T-vector 50 ngを加えてDNA結合反応を行い、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、プラスミドpT7mg3-3を得た。核酸配列の確認はABI377自動シーケンサー (Applied Biosystems社)を用いて行い、マウスG3PDHの部分配列 (配列番号27) を得た。

### (3) 鋳型cDNAの作製

試験例2と同様の方法で、BALB/c系マウス (雄性、7週齢、日本チャールス・リバー) に生理食塩水に溶解した30 ng/mL LPS溶液0.1 mLを気管内投与

し、0、3、6、12時間後(各群n=6)に肺胞洗浄を行い、BALFを回収した。BALFは4°C、3000 rpmで10分間遠心分離し、上清を除去後、沈殿した細胞を肺浸潤細胞試料とした。全RNAの抽出は、guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC)法にて行った。得られた全RNA(20  $\mu$  L)の半量を用いて、SUPERScript Preamplification System(Invitrogen社)により、添付のマニュアルに従ってcDNAを作製した。

#### (4) TaqMan PCRによる定量

TaqMan PCRによるGPR4 mRNAの定量はABI PRISM 7700 Sequence Detection System(Applied Biosystems社)を用いて行った。PCRは、上記cDNA 1  $\mu$  L、2 x TaqMan Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems社) 15  $\mu$  L、TaqMan プローブ(配列番号19) 250 nmol/L、プライマー(配列番号20および配列番号21)各々1  $\mu$  mol/Lを含む30  $\mu$  Lの反応液を用い、50°Cで2分間、95°Cで10分間保持した後、95°Cで15秒間、60°Cで1分間のサイクルを40回繰り返すことにより行った。検量線を作成するために上記(2)で作製したプラスミドを用いて濃度の異なる標準サンプルを調製し、肺浸潤細胞試料cDNAと同時にPCRを行った。反応終了後、蛍光発光量よりPCRプロダクト量を算出し、作成した検量線から肺浸潤細胞試料におけるGPR4 mRNAの量を算出した。内部標準に用いたG3PDH mRNAの定量はTaqManプローブ(配列番号22)、プライマー(配列番号23および配列番号24)を用いて同様の方法で行った。GPR4 mRNAの発現量は、各時間でG3PDH mRNAに対する比を求め、さらに基準となるLPS投与0時間を1とした相対値で表した。結果を第8図に示す。これよりBALF中に浸潤してくる細胞にGPR4が、発現していることが示された。

#### 試験例7：SPC誘発気道内浸潤細胞におけるGPR4 mRNAの発現解析

試験例6と同様の方法を用いてGPR4 mRNAの定量を行った。

##### (1) 鋳型cDNAの作製

試験例3と同様の方法で、BALB/c系マウス(雄性、7週齢、日本チャールス・リバー)に0.1%牛血清アルブミン水溶液に溶解した1 mg/mL SPC溶液0.1 mLを気管内投与し、0 (n=11)、6 (n=10)、24 (n=11)時間後に肺胞洗浄を行い、BALFを回収した。BALFは4°C、3000 rpmで10分間遠心分離し、上清を除

去後、沈殿した細胞を肺浸潤細胞試料とした。全RNAの抽出は、AGPC法にて行った。得られた全RNA(20  $\mu$ L)の半量を用いて、SUPERScript Preamplification System(Invitrogen社)により、添付のマニュアルに従ってcDNAを作製した。

## (2) TaqMan PCRによる定量

TaqMan PCRによるGPR4mRNAの定量はABI PRISM 7700 Sequence Detection System(Applied Biosystems社)を用いて行った。PCRは、上記cDNA 1  $\mu$ L、2 x TaqMan Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems社) 15  $\mu$ L、TaqMan プローブ(配列番号19) 250 nmol/L、プライマー(配列番号20および配列番号21)各々1  $\mu$ mol/Lを含む30  $\mu$ Lの反応液を用い、50°Cで2分間、95°Cで10分間保持した後、95°Cで15秒間、60°Cで1分間のサイクルを40回繰り返すことにより行った。検量線を作成するために試験例6の(2)に記載したプラスミドを用いて濃度の異なる標準サンプルを調製し、肺浸潤細胞試料cDNAと同時にPCR反応を行った。反応終了後、蛍光発光量よりPCRプロダクト量を算出し、作成した検量線から肺浸潤細胞試料におけるGPR4 mRNAの量を算出した。内部標準に用いたG3PDH mRNAの定量はTaqManプローブ(配列番号22)、プライマー(配列番号23および配列番号24)を用いて同様の方法で行った。GPR4 mRNAの発現量は、各時間でG3PDH mRNAに対する比を求め、さらに基準となるSPC投与0時間を1とした相対値で表した。結果を第9図に示す。これよりBALF中に浸潤してくる細胞にGPR4が、発現していることが示された。

## 試験例8： マウス敗血症モデルでのTNF- $\alpha$ 産生抑制作用

BALB/c系マウス(雄性、7週齢、日本チャールス・リバー)に、LPSを最終濃度0.2mg/mLとなるように滅菌したリン酸緩衝溶液(以下PBSと記す、NaCl:9g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O:0.795g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:0.144gを1Lの蒸留水に溶解し、高圧蒸気滅菌したもの)に溶解し、体重100gあたり1mLを尾静脈内投与し、1時間後に眼底より採血して血清を分離した。試験化合物投与群には、LPS投与60分前に化合物1を0.5w/v%メチルセルロース溶液(和光純薬工業社製)に懸濁させた溶液を、体重100gあたり1mL経口投与した。また、溶媒投与群として0.5w/v%メチルセルロース溶液のみを同様に経口投与した。血清中の

TNF- $\alpha$ 濃度は、ELISAキット（エンドジェン社製）により測定した。TNF- $\alpha$ 産生の抑制率（％）は、各群のTNF- $\alpha$ 濃度から下記の式にしたがって計算した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \{(A - B) / C\} \times 100$$

A：溶媒投与群

B：試験化合物投与群

C：溶媒投与群

その結果を第16表に示した。値は平均値±標準誤差を意味し、\*\*\*は $P < 0.001$ （溶媒投与群対比、Dunnett検定）を表す。なお、第16表中の「N.D.」は「検出せず（not detective）」を表す。

第 16 表

| 投与群   | 用量<br>(mg/kg) | TNF- $\alpha$ 産生量<br>(pg/mL) | 阻害率(%) |
|-------|---------------|------------------------------|--------|
| 未処置   | -             | N.D.                         | -      |
| 溶媒    | -             | 1733.9 ± 143.9               | -      |
| 化合物 1 | 30            | 800.9 ± 86.3 ***             | 54     |
|       | 100           | 560.9 ± 66.0 ***             | 68     |

上記の結果は、化合物（I）の投与によりTNF- $\alpha$ の産生が抑制されることを示している。

本モデルは、古くから敗血症モデルとしてよく用いられてきた [イムノロジー (Immunology)、Jul;70(3)、p309-14 (1990年)]。上記のように、化合物1が本モデルで有効であったことから、化合物（I）の投与により敗血症を抑制できると考えられる。

**試験例9： ラット連鎖球菌細胞壁誘発関節炎モデルでの評価**

ラット連鎖球菌細胞壁誘発関節炎モデルは、Lewis系ラット（雌性、8週齢、日本チャールス・リバー社）を用いて、Schimmerらの方法（Schimmer RC. et al., J. Immunol., 159, 4103-4108, 1997）に準じ、以下のようにして作製した。

連鎖球菌細胞壁（streptococcal cell wall、以下SCWと記す）由来のペプチドグリカンポリサッカライド（peptidoglycan polysaccharide）100Pフラクション溶液（以下PG-PS 100Pと記す、リー・ラボラトリーズ社製）を滅菌したPBSで希釈して0.6mg/mLとし、超音波洗浄器（US-1型、エスエヌディ社製）を用いて20分間超音波粉碎した後、一匹あたり6 $\mu$ g/10 $\mu$ Lで右後肢踵関節内に投与した。一方、左後肢踵関節内には、一匹あたり10 $\mu$ L滅菌PBSを投与した。さらに感作後21日目に、PG-PS 100Pを滅菌PBSで希釈して0.2mg/mLとし、20分間超音波粉碎したものを一匹あたり100 $\mu$ g/500 $\mu$ Lで尾静脈より静脈内投与して関節炎を誘発させた。一群は6匹とした。試験化合物投与群には、試験化合物1を0.5w/v%メチルセルロース溶液に懸濁し、感作後21日目から24日目まで、1日1回、各個体に体重100gあたり1mLを経口投与した。また、溶媒投与群には、0.5w/v%メチルセルロース溶液を同様に経口投与した。さらに未処置群をおき、これらにはSCW投与および薬物投与を行わなかった。初回感作日（0日目）と初回感作後24日目に、ラット後肢容積をプレチスモメーターTK-101（ユニコム社製）で測定し、下記の式に従って浮腫容積変化を計算した。

$$\text{浮腫容積変化} = (\text{24日目の右後肢容積} - \text{0日目の右後肢容積}) - (\text{24日目の左後肢容積} - \text{0日目の左後肢容積})$$

また浮腫抑制率（%）は、下記の式にしたがって計算した。

$$\text{浮腫抑制率}(\%) = [(A - B) / (A - C)] \times 100$$

A：溶媒投与群の浮腫容積変化

B：試験化合物投与群の浮腫容積変化

C：未処置群の浮腫容積変化

その結果を第17表に示した。値は平均値±標準誤差を意味し、†††は $P<0.001$ （未処置群対比、Aspin-Welch検定）、\*\*\*は $P<0.001$ （溶媒投与群対比、Dunnett検定）を表す。

第 17 表

| 投与群   | 用量<br>(mg/kg) | 浮腫容積変化<br>(mL)           | 浮腫抑制率(%) |
|-------|---------------|--------------------------|----------|
| 未処置   | -             | -0.01±0.00               | -        |
| 溶媒    | -             | 0.74±0.05 <sup>†††</sup> | -        |
| 化合物 1 | 30            | 0.40±0.07 <sup>***</sup> | 45       |
|       | 100           | 0.32±0.03 <sup>***</sup> | 56       |

本試験においては、抗TNF- $\alpha$ 抗体が著効を示すことが報告されており（Schrier DJ. et al., J. Leukoc. Biol., 63, 359-363, 1998）、ヒトにおける関節リウマチや乾癬性関節炎との類似性が高い。従って、本試験の結果は、化合物（I）の投与により関節リウマチや乾癬性関節炎などの関節炎の症状を抑制できることを示していると考えられる。

#### 試験例 10： タバコ煙誘発気道内好中球浸潤に対する抑制作用

以下の試験は、公知の方法〔ジャーナル・オブ・ナショナル・キャンサー・インスティテュート（Journal of the National Cancer Institute）、64 巻、273-84 ページ（1980 年）〕を改変して行った。

7 週齢の雄性 SD ラットを噴霧用プラスチックケージにラットを入れ、喫

煙曝露装置を用いてタバコ煙を 5 分間（タバコ 5-6 本）曝露した後、空気で 10 分間換気した。この操作を 8 回繰り返した。また、タバコ煙曝露におけるタバコと空気の希釈比率は、1:9（10% タバコ煙）とした。

化合物 1 は 3 および 10 mg/mL になるように 0.5 w/v% メチルセルロース 400cP (MC、和光純薬工業社) 溶液に懸濁して薬物懸濁液とした。溶媒投与群および薬物投与群にそれぞれ溶媒（0.5 w/v% MC）および薬物懸濁液を 10 mL/kg の容量でタバコ煙曝露開始の 3 時間前と 10 時間後に経口投与した。非曝露群には溶媒投与およびタバコ煙曝露を行わなかった。

タバコ煙曝露 24 時間後に気管支肺胞洗浄（BAL）を実施した。すなわち、ラットをソムノペンチル（武田シェリング・プラウアニマルヘルス社）腹腔内投与により麻酔し、気管カニューレを介して phosphate buffered saline (ICN 社) で BAL を実施し、気管支肺胞洗浄液（BALF）を得た。

BALF の総白血球数は自動血球カウンター（日本光電社）を用いて測定した。また、細胞の塗抹標本を作成し、ギムザ染色をした後、光学顕微鏡にて観察し、好中球の細胞数を数えて比率を算出した。好中球数は総白血球数に好中球の細胞数比率を掛け合わせて算出した。

結果を第 18 表に示す。なお好中球数の各値は平均値±標準誤差で示してある。

第 18 表

| 群     | 投与量 (mg/kg) | 個体数 | 好中球 ( $10^6$ /BALF) | 抑制率 (%) |
|-------|-------------|-----|---------------------|---------|
| 非曝露   | -           | 12  | 0.00±0.00           | -       |
| 溶媒    | -           | 11  | 1.11±0.49           | -       |
| 化合物 1 | 30          | 11  | 0.42±0.08           | 62      |
| 化合物 1 | 100         | 12  | 0.40±0.13           | 64      |

以上の結果、化合物 1 は 30 および 100 mg/kg の用量で、溶媒投与群における BALF 中好中球の増加をそれぞれ 62、64% 抑制した。つまり、化合物を投与することにより肺への好中球の浸潤が抑制された。

COPD は慢性気管支炎と肺気腫をほぼ含む病態であり、その特徴として肺

胞内への好中球浸潤が認められる(Thorax, 53, 137-147, 1998)。COPDの主要原因の1つは喫煙であると考えられている(Thorax, 53, 137-147, 1998)。COPDの病態モデルとして汎用されている試験例10における上記の結果から、化合物(I)またはその薬理学的に許容される塩はCOPDなどの肺疾患に対して、治療および／または予防効果が得られると考えられる。

本発明に係る医薬は、配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質、配列番号12記載の塩基配列から選ばれる連続した15～60塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体等、配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体等、式(I)で表される含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩、ならびにそれらの水和物および溶媒和物からなる群から選ばれる物質を有効成分として含むことを特徴とする。本発明に係る医薬としては、有効成分である上記物質をそのまま投与してもよいが、一般的には、有効成分である上記の物質と1または2以上の製剤用添加物とを含む医薬組成物の形態で投与することが望ましい。このような医薬組成物は、それ自体製剤学の分野で周知または慣用の方法に従って製造することが可能である。また、医薬組成物の形態である本発明に係る医薬には、他の医薬の有効成分が1または2以上含まれていてもよい。なお、本発明の医薬は、ヒトを含む哺乳類動物に適用可能である。

本発明の医薬の投与経路は特に限定されず、経口投与または静脈内投与等の非経口投与のいずれかから治療および／または予防のために最も効果的な投与経路を適宜選択することができる。経口投与に適する製剤の例としては、例えば、錠剤等を挙げることができ、非経口投与に適する製剤の例としては、例えば、注射剤等を挙げることができる。

錠剤等の固形製剤の製造には、例えば、乳糖、マンニット等の賦形剤；デンプン等の崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤；ヒドロキシプロピルセルロース等の結合剤；脂肪酸エステル等の界面活性剤；グリセリン等の可塑剤等を用いることができる。



非経口投与に適する製剤のうち注射剤等の血管内投与用製剤は、好ましくはヒト血液と等張の水性媒体を用いて調製することができる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、塩水とブドウ糖溶液の混合物等から選ばれる水性媒体を用い、常法に従って適当な助剤とともに溶液、懸濁液、または分散液として調製することができる。非経口用の製剤の製造には、例えば、希釈剤、香料、防腐剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、界面活性剤、可塑剤等から選択される1または2以上の製剤用添加物を用いることもできる。

本発明の医薬の投与量および投与頻度は特に限定されず、有効成分である上記物質の種類、投与経路、治療および／または予防の目的、患者の年齢および体重、症状の性質および重篤度等の種々の条件に応じて適宜選択することが可能である。例えば、成人1日当り0.1~100mg/kgを3~4回に分けて投与するのが好ましい。しかしながら、これら投与量および投与回数は前述の種々の条件等により変動する。

以下に、本発明を参考例および実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例等により限定されることはない。

下記参考例中の各化合物の物理化学的データは、以下の機器類によって測定した。

<sup>1</sup>H NMR: JEOL JNM-EX270 (270 MHz)またはJEOL JNM-GX270 (270 MHz)

MS: Micromass LCTまたはMicromass Quattro (APCI法により測定)

参考例1: 化合物1 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(4-メチルピペラジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}の合成

特開平7-61983に記載された2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン (30.0 g, 78.4 mmol) をクロロホルム (300 mL) と酢酸 (300 mL) の混合溶媒に溶解し、1-メチルピペラジン (23.6 g, 236 mmol) およびホルムアルデヒド (37 %水溶液、7.64 g, 94.1 mmol) を加え、60°Cに加熱し、18時間攪拌した。反応の進行を薄層クロマトグラフィーで確認した後、

氷冷下に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和重曹水、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下で濃縮した。析出した結晶を酢酸エチルでトリチュレーションし、化合物 1 (27.4 g, 55.4 mmol, 収率71%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  495 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 2.27 (s, 3 H), 2.45 (m, 8 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.38 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.00 (s, 1 H), 6.57-6.66 (m, 2 H), 6.79-7.00 (m, 5 H).

また、対応するフマル酸塩を以下の方法に従って調製した。

上記の化合物 1 (15 g) をメタノール (110 mL) に溶解し、フマル酸 7.0 g (2.0当量) を加えた。結晶の析出した懸濁液を一旦濃縮乾固し、アセトニトリル (100 mL) を加え懸濁液を1時間以上攪拌した。その後、結晶を濾取して、減圧下、乾燥することによりにより化合物 1 の2フマル酸塩を得た (20.1 g, 収率 91%)。

参考例 2: 化合物 2 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

1-メチルピペラジンの代わりに1,2,3,6-テトラヒドロピリジンを用い、参考例 1 と同様にして、特開平7-61983に記載された2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピンから収率20%で化合物 2 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  478 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.04 (m, 2 H), 2.53 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2 H), 2.60 (s, 3 H), 2.62 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.86-3.02 (m, 6 H), 3.45 (s, 2 H), 5.33 (s, 2 H), 5.64 (m, 1 H), 5.74 (m, 1 H), 6.02 (s, 1 H), 6.57-6.70 (m, 2 H), 6.78-6.82 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.95-7.00 (m, 2 H).

参考例 3 : 化合物 3 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(ピロリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

1-メチルピペラジンの代わりにピロリジンを用い、参考例 1 と同様にし、特開平7-61983に記載された2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピンから収率20%で化合物 3 を得た。

APCI-MS: m/z 466 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 1.78 (m, 4 H), 2.50 (m, 4 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.50 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.02 (s, 1 H), 6.58-6.66 (m, 2 H), 6.79-6.81 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.98-7.02 (m, 2 H).

参考例 4 : 化合物 4 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-モルホリノメチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

1-メチルピペラジンの代わりにモルホリンを用い、参考例 1 と同様にし、特開平7-61983に記載された2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピンから収率46%で化合物 4 を得た。

APCI-MS: m/z 482 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.43 (m, 4 H), 2.60 (m, 3 H), 2.63 (m, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.38 (s, 2 H), 3.69 (m, 4 H), 5.34 (s, 2 H), 6.07 (s, 1 H), 6.58-6.67 (m, 2 H), 6.78-6.81 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.96-7.01 (m, 2 H).

参考例 5 : 化合物 5 ~ 化合物 12 の合成

特開平7-61983に記載された2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン (19 mg, 0.050 mmol) をクロロホルム (0.30 mL) と酢酸 (0.30

mL) の混合溶媒に溶解し、対応する  $R^5R^6NH$  のクロロホルム溶液 (1.0 mol/L, 0.15 mL) およびホルムアルデヒド (37 % 水溶液、0.005 mL) を加え、60°C に加熱し、20時間攪拌した。反応の進行を薄層クロマトグラフィーで確認した後、溶媒を留去し、残渣をクロロホルムに溶解させ、水洗を2回施した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、濃縮し、残渣にクロロホルム (0.50 mL) および *N*-メチルイサト酸無水物 ポリスチレン (*N*-Methylisatoic anhydride polystyrene、ノババイオケム社製、0.15 mL) を加え、室温で終夜攪拌した。反応混合物中のレジンを選択し、残渣をイオン交換クロマトグラフィー (ボンデシルSCX、バリアン社製、2 mol/Lアンモニア-メタノール溶液で溶出) で精製し、目的物である化合物 5 ~ 化合物 12 を得た。

化合物の構造を第1表に、分析値 (APCI-MS) を第14表に記した。

参考例6：化合物 13 {ヨウ化1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3*H*-イミダゾ[4,5-*b*]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5*H*-ジベンゾ[*b,f*]アゼピン-2-イルメチル]-1-メチルピロリジニウム} の合成

参考例3で得られた化合物 3 (11.4 g, 24.5 mmol) をジクロロメタン (200 mL) に溶解し、ヨウ化メチル (1.98 mL, 31.8 mmol) を加え、室温で10時間攪拌した。反応溶液を減圧下、濃縮した後、酢酸エチルを加えた。得られた懸濁液を60°Cに加熱し0.5時間攪拌し、その後室温で1時間攪拌した。析出した固体を濾取して、化合物 13 (13.7 g, 22.5 mmol, 収率92%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  480 ( $[M - I]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.31 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 2.13 (br s, 2 H), 2.25 (br s, 2 H), 2.58 (s, 3 H), 2.62 (s, 2 H), 2.79 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.85 (m, 4 H), 3.06 (s, 3 H), 3.52 (br s, 2 H), 3.83 (br s, 2 H), 4.74 (s, 2 H), 5.32 (s, 2 H), 6.76 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.95-7.18 (m, 4 H), 7.43 (s, 1 H).

参考例7：化合物 14 {2-(2,5-ジヒドロピロール-1-イルメチル)-8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3*H*-イミダゾ[4,5-*b*]ピリジン-3-イルメ

チル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

1-メチルピペラジンの代わりに2,5-ジヒドロピロールを用い、参考例1と同様にして、特開平7-61983号に記載された2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピンから収率82%で化合物14を得た。

APCI-MS: m/z 464 ([M + H]<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 1.30 (t, J = 7.5 Hz, 3 H), 2.59 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q, J = 7.5 Hz, 2 H), 2.9-3.1 (m, 4 H), 3.45 (s, 4 H), 3.70 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 5.87 (s, 2 H), 6.07 (s, 1 H), 6.59 (d, J = 8.7 Hz, 2 H), 6.63 (d, J = 8.7 Hz, 2 H), 6.75-6.85 (m, 2H), 6.88 (s, 1 H), 7.00-7.05 (m, 2 H).

参考例8: 化合物15 {N-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]-N-メチルアミノ}酢酸メチルエステル}の合成

1-メチルピペラジンの代わりにサルコシンメチルエステル塩酸塩を用い、参考例1と同様にして、特開平7-61983号に記載された2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピンから収率31%で化合物15を得た。

APCI-MS: m/z 498 ([M + H]<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 1.30 (t, J = 7.6 Hz, 3 H), 2.36 (s, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q, J = 7.6 Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.23 (s, 2 H), 3.53 (s, 2 H), 3.70 (s, 3 H), 5.34 (s, 2 H), 5.98 (s, 1 H), 6.59-6.67 (m, 2 H), 6.82 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.97-7.02 (m, 2 H).

参考例9: 化合物16 {1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]ピペリジン-4-カルボン酸エチルエステル} の合成

1-メチルピペラジンの代わりにイソニベコチン酸エチルエステルを用い、

参考例 1 と同様にして、特開平 7-61983 号に記載された 2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピンから収率 60% で化合物 16 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  552 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.23 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3 H), 1.30 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 1.68-1.90 (m, 6 H), 1.97 (td,  $J = 11.3, 2.7$  Hz, 2 H), 2.26 (m, 1 H), 2.60 (s, 3 H), 2.62 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.83 (m, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.36 (s, 2 H), 4.11 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2 H), 5.33 (s, 2 H), 6.03 (s, 1 H), 6.57-6.66 (m, 2 H), 6.78-6.82 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.94-6.99 (m, 2 H).

参考例 10 : 化合物 17 <2-[N-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]-N-メチルアミノ}エタノール> の合成  
水素化アルミニウムリチウム (15.7 mg, 0.38 mmol) をテトラヒドロフラン (0.3 mL) に懸濁させ、氷冷下、攪拌しながら、テトラヒドロフラン (0.9 mL) に溶解した、参考例 8 で得られた化合物 15 (126 mg, 0.253 mmol) を加え、室温で 1.5 時間攪拌した。反応の進行を薄層クロマトグラフィーで確認した後、攪拌しながら水 (0.016 mL)、2 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 (0.016 mL)、水 (0.048 mL) を順次滴下した。析出物を濾別し、濾液を濃縮した残渣を NH-シリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: 酢酸エチル) で精製して、化合物 17 (47.6 mg, 0.101 mmol, 収率 40%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  470 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 1.7 (br s, 1 H), 2.21 (s, 3 H), 2.57 (t,  $J = 5.5$  Hz, 2 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.80 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.44 (s, 2 H), 3.61 (t,  $J = 5.5$  Hz, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 5.99 (s, 1 H), 6.59-6.67 (m, 2 H), 6.81 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.91-6.98 (m, 2 H).

参考例 11 : 化合物 18 <1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダ

ゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ  
[b,f]アゼピン-2-イルメチル}ピペリジン-4-イル}メタノール>の合成  
化合物15の代わりに化合物16を用い、参考例10と同様にして、収率  
50%で化合物18を得た。

APCI-MS: m/z 510 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 1.24-1.74 (m, 6 H),  
1.91 (m, 2 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H),  
2.86-3.02 (m, 6 H), 3.37 (s, 2 H), 3.48 (d,  $J = 6.3$  Hz, 2 H), 5.34 (s,  
2 H), 5.98 (s, 1 H), 6.58-6.67 (m, 2 H), 6.82 (m, 2 H), 6.89 (s, 1 H),  
6.94-7.00 (m, 2 H).

参考例12: 化合物19<[N-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダ  
ゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ  
[b,f]アゼピン-2-イルメチル]-N-メチルアミノ}酢酸>の合成

参考例8で得られた化合物15 (151 mg, 0.303 mmol) をメタノール (3.0  
mL) に溶解し、1mol/L水酸化ナトリウム/メタノール溶液 (1.5 mL) を加え、  
60°Cに加熱し、9時間攪拌した。反応の進行を薄層クロマトグラフィーで確  
認した後、室温に冷却し、4mol/L塩酸を加え、pHを6.0に調整した。析出し  
た結晶を濾取し、減圧下で乾燥した。この結晶をエチルエーテルに懸濁させ、  
加熱還流条件下、1時間攪拌し、さらに室温で1時間攪拌した。結晶を濾取し、  
減圧下で乾燥させて、化合物19 (119 mg, 0.246 mmol, 収率81%) を得た。

APCI-MS: m/z 483 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.23 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 2.34 (s, 3 H),  
2.48-2.52 (s x 2, 6 H, DMSOとオーバーラップ), 2.78 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2  
H), 2.89 (m, 4 H), 3.11 (s, 2 H), 3.66 (s, 2 H), 5.29 (s, 2 H), 6.75-7.02  
(m, 7 H), 8.36 (s, 1 H).

参考例13: 化合物20 {1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダ  
ゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ  
[b,f]アゼピン-2-イルメチル}ピペリジン-4-カルボン酸} の合成

化合物 15 の代わりに化合物 16 を用い、参考例 12 と同様にして、収率 70% で化合物 20 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  524 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.23 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 1.52 (m, 2 H), 1.75 (m, 2 H), 1.97 (m, 2 H), 2.18 (m, 1 H), 2.48-2.54 (s x 2, 6 H, DMSO とオーバーラップ), 2.71-2.92 (m, 8 H), 3.32 (s, 2 H), 5.29 (s, 2 H), 6.75-6.94 (m, 7 H), 8.23 (s, 1 H).

参考例 14: 化合物 21  $\{N-[8-(2\text{-エチル}-5,7\text{-ジメチル}-3H\text{-イミダゾ}[4,5-b]\text{ピリジン}-3\text{-イルメチル})-10,11\text{-ジヒドロ}-5H\text{-ジベンゾ}[b,f]\text{アゼピン}-2\text{-イルメチル}]-N\text{-メチルアミノ}\}$ アセトニトリルの合成

参考例 6 で得られた化合物 13 (700 mg, 1.15 mmol) をクロロホルム (1.2 mL) に溶解し、メチルアミノアセトニトリル (368 mg, 3.46 mmol) およびトリエチルアミン (0.561 mL, 4.03 mmol) を加え、加熱還流条件下、終夜撹拌した。反応液を室温まで冷却し、飽和重曹水を加え、クロロホルムで 3 回抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: メタノール/クロロホルム = 1/99) で精製した。目的物を含む画分の濃縮残渣にエタノールを加え、得られた懸濁液を 60°C で 0.5 時間撹拌し、その後室温で 1 時間撹拌した。析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥させることにより、化合物 21 (415 mg, 0.893 mmol, 収率 78%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  465 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.42 (s, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.43 (s, 2 H), 3.48 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.10 (s, 1 H), 6.58-6.69 (m, 2 H), 6.78-6.83 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.95-7.02 (m, 2 H).

参考例 15: 化合物 22  $\{N-[8-(2\text{-エチル}-5,7\text{-ジメチル}-3H\text{-イミダゾ}[4,5-b]\text{ピリジン}-3\text{-イルメチル})-10,11\text{-ジヒドロ}-5H\text{-ジベンゾ}$



[b,f]アゼピン-2-イルメチル}-N-[2-(ピロリジン-1-イル)エチル]アミン・2フマル酸塩} の合成

#### 工程 1

後記の参考例 24 で得られた化合物 93 (1.25 g, 3.03 mmol) をクロロホルム (54 mL) およびアセトン (6 mL) の混合溶媒に溶解し、二酸化マンガ (2.7 g, 31 mmol) を加えて室温で終夜攪拌した。反応の進行を薄層クロマトグラフィーで確認した後、固形物をセライトを通じて濾別し、濾液を濃縮した。残渣に酢酸エチルを加えて得られる懸濁液を加熱還流条件下 0.5 時間攪拌し、その後室温に冷却してさらに 0.5 時間攪拌した。析出した結晶を濾取し、減圧下乾燥させることにより 8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボアルデヒド (1.02 g, 2.48 mmol, 収率 82%) を得た。

APCI-MS: m/z 411 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.31 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.64 (s, 3 H), 2.80 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.99 (m, 2 H), 3.06 (m, 2 H), 5.37 (s, 2 H), 6.60-6.91 (m, 6 H), 7.52-7.61 (m, 2 H), 9.77 (s, 1 H).

#### 工程 2

工程 1 で得られた 8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボアルデヒド (0.300 g, 0.73 mmol) をテトラヒドロフラン (10 mL) およびクロロホルム (6 mL) の混合溶媒に懸濁させ、これに 2-(ピロリジン-1-イル)エチルアミン (139  $\mu\text{L}$ , 1.10 mmol) を加えて 10 分間、加熱還流した。その後、反応溶液を室温まで冷却してトリアセトキシホウ素化ナトリウム (464 mg, 2.19 mmol) を加えて 12 時間、室温で攪拌した。反応溶液に酢酸エチルと 1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を加え、有機層を無水硫酸マグネシウムを加えて乾燥させた。その後、溶液を減圧下、濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: クロロホルム/2mol/L アンモニア・メタノール溶液=20/1) で精製して、N-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジ

ヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]-N-[2-(ピロリジン-1-イル)エチル]アミン (0.301 g, 0.592 mmol, 収率81%) を得た。これを参考例 1 と同様な方法でフマル酸塩として化合物 2 2 を得た。

APCI-MS: m/z 509 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.23 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 1.65-1.85 (m, 4 H), 2.50 (s, 3H), 2.51 (s, 3H), 2.6-2.7 (m, 4 H), 2.7-3.0 (m, 8 H), 3.86 (s, 2 H), 5.29 (s, 2 H), 6.55 (s, 4 H), 6.75-6.95 (m, 6 H), 7.0-7.15 (m, 2 H), 8.43 (s, 1 H).

参考例 1 6 : 化合物 2 3 {N-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]-N-(2-メトキシエチル)アミン・1フマル酸塩} の合成

2-(ピロリジン-1-イル)エチルアミンの代わりに2-メトキシエチルアミンを用い、参考例 1 5 の工程 2 と同様に、収率78%でN-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]-N-(2-メトキシエチル)アミンを得た。これを参考例 1 と同様な方法でフマル酸塩として化合物 2 3 を得た。

APCI-MS: m/z 470 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.23 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 2.50 (s, 3H), 2.51 (s, 3H), 2.80 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2 H), 2.8-3.0 (m, 6 H), 3.24 (s, 3 H), 3.49 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2 H), 3.80 (s, 2H), 5.29 (s, 2 H), 6.48 (s, 2 H), 6.84 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H), 6.85-7.0 (m, 4 H), 7.0-7.1 (m, 2 H), 8.43 (s, 1 H).

参考例 1 7 : 化合物 2 4 (2-[[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]アミノ}エタノール・0.5フマル酸塩) の合成  
2-(ピロリジン-1-イル)エチルアミンの代わりに2-エタノールアミン

を用い、参考例 15 の工程 2 と同様にして、収率 39% で 2-[[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]アミノ}エタノールを得た。

これを参考例 1 と同様な方法でフマル酸塩として化合物 24 を得た。

APCI-MS: m/z 456 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.23 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 2.50 (s, 3H), 2.51 (s, 3H), 2.70-2.75 (m, 2 H), 2.77 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2 H), 2.85-2.9 (m, 4 H), 3.55 (t,  $J = 5.5$  Hz, 2 H), 3.78 (s, 2H), 5.29 (s, 2 H), 6.44 (s, 1 H), 6.79 (dd,  $J = 1.5$  Hz, 8.3 Hz, 1 H), 6.85-6.95 (m, 4 H), 7.0-7.1 (m, 2 H), 8.39 (s, 1 H).

参考例 18 : 化合物 25 < [[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イル]メチル}アミン・1フマル酸塩> の合成

参考例 6 で得られた化合物 13 (0.300 g, 0.516 mmol) を 7mol/L-アンモニア/メタノール溶液 (5 mL) に溶解し、封管して 80°C で 48 時間加熱した。その後、反応溶液を減圧下、濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: クロロホルム / 2mol/L-アンモニア/メタノール溶液=20/1) で精製して、[[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イル]メチル}アミン (0.135 g, 0.329 mmol, 収率 64%) を得た。

これを参考例 1 と同様な方法でフマル酸塩として化合物 25 を得た。

APCI-MS: m/z 412 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.23 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 2.50 (s, 3H), 2.51 (s, 3H), 2.77 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2 H), 2.85-2.9 (m, 4 H), 3.81 (s, 2H), 5.29 (s, 2 H), 6.42 (s, 2 H), 6.8-7.0 (m, 5 H), 7.0-7.15 (m, 2 H), 8.46 (s, 1 H).

参考例 19 : 化合物 26 {N-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダ

ゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ  
[b,f]アゼピン-2-イルメチル]-N-メチル-N-(2H-テトラゾール-5-  
-イルメチル)アミン} の合成

参考例6で得られた化合物13 (667 mg, 1.10 mmol) をクロロホルム (11 mL) に溶解し、後記の参考例22で得られたN-メチル-N-(2-トリチル-2H-テトラゾール-5-イルメチル)アミン (390 mg, 1.10 mmol) およびトリエチルアミン (0.31 mL, 2.3 mmol) を加えて60°Cで終夜撹拌した。反応液を室温まで冷却し、飽和重曹水を加え、クロロホルムで3回抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をシリカゲル (溶出溶媒: メタノール/クロロホルム=2/98) に通じて原点成分を除去し、濃縮した。残渣にアセトン (1.9 mL)、水 (1.9 mL) および酢酸 (1.9 mL) を加え、60°Cで1.5時間撹拌した。反応液を0°Cまで冷却し、析出物を濾別し、濾液を濃縮した。残渣をエタノールから再結晶して、化合物2.6 (66.7 mg, 0.131 mmol, 収率12%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  508 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.32 (t,  $J = 5.0$  Hz, 3 H), 2.58 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.75-2.79 (m, 7 H), 2.81 (q,  $J = 5.0$  Hz, 2 H), 4.08 (s, 2 H), 4.28 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.37 (s, 1 H), 6.46 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H), 6.58 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H), 6.72-6.80 (m, 2 H), 6.84-6.94 (m, 3 H).

参考例20: 化合物27 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ  
[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-[4-(2H-テトラゾール-5-イル)  
ピペリジン-1-イルメチル]-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼ  
ピン} の合成

メチルアミノアセトニトリルの代わりにピペリジン-4-カルボニトリルを用い、参考例14と同様にして、収率58%で1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]ピペリジン-4-カルボニトリルを得た。

得られた1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリ

ジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]ピペリジン-4-カルボニトリル (0.252 g, 0.500 mmol) をトルエン (4 mL) に溶解し、トリメチルシリルアジド (0.13 mL, 1.00 mmol) および酸化ジブチルスズ (12.4 mg, 0.05 mmol) を加え、110°Cで22時間、加熱攪拌した。反応溶液を減圧下、濃縮した後、残渣にエタノールを加えた。得られた懸濁液を0.5時間、加熱還流した後、固体を濾取して、化合物 27 (0.110 g, 0.200 mmol, 収率40%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  548 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.22 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 1.65-1.85 (m, 2 H); 1.9-2.05 (m, 2 H), 2.2-2.35 (m, 2 H), 2.48 (s, 3H), 2.58 (s, 3H), 2.77 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2 H), 2.85-3.05 (m, 7 H), 3.52 (s, 2H), 5.29 (s, 2 H), 6.85-7.05 (m, 8 H), 8.36 (s, 1 H).

#### 参考例 21 : 化合物 28 ~ 化合物 90 の合成

##### 工程 1

ヨウ化1-(10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル)-1-メチルピペリジニウム (0.015 g, 0.050 mmol) をジメチルホルムアミド (0.50 mL) に溶解し、対応するYH (式中、Yは前記と同義である) のクロロホルム溶液 (1.0 mmol/L, 0.060 mL) および水酸化リチウム・1水和物 (0.070 g) を加え、室温で20時間攪拌した。反応の進行を薄層クロマトグラフィーで確認した後、溶媒を留去し、残渣をジクロロメタンに溶解させ、得られた溶液を水で3回洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、濃縮し、残渣にクロロホルム (0.60 mL) およびN-メチルイサト酸無水物 ポリスチレン (N-Methylisatoic anhydride polystyrene、ノババイオケム社製、0.15 mL) を加え、室温で終夜攪拌した。反応混合物中のレジンを選択的に濾別し、濾液を濃縮した後、残渣をイオン交換クロマトグラフィー (ボンデシル SCX、バリアン社製、2 mol/Lアンモニア-メタノール溶液で溶出) で精製し、製造法 1 における化合物 (IV) に相当する各種中間体を得た。

##### 工程 2

参考例 5 と同様にして、工程 1 で得られた製造法 1 における化合物 (IV)

に相当する各種中間体と相当する $R^5R^6NH$ （式中、 $R^5$ および $R^6$ はそれぞれ前記と同義である）から、目的物である化合物 28～化合物 90 を得た。なお、化合物 41、42、48 および 89 はシュウ酸塩として単離した。

化合物 28～化合物 87 の構造と分析値（APCI-MS）を第 2 表～第 6 表に記した。また、化合物 29、30、36、41、42、48、53、54、60、65、66、72、77、78 および 84 の分析値（ $^1H$  NMR）を以下に示した。

化合物 29 {2-(ベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

$^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.0-2.1 (m, 2 H), 2.44 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2 H), 2.75-2.85 (m, 2 H), 2.9-3.0 (m, 4 H), 3.32 (s, 2 H), 5.31 (s, 2 H), 5.5-5.8 (m, 2 H), 6.8-7.1 (m, 6 H), 7.1-7.3 (m, 2 H), 7.56 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1 H), 7.62 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1 H), 8.28 (s, 1 H), 8.35 (s, 1 H).

化合物 30 {2-(ベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-(ピロリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

$^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.5-1.7 (m, 4 H), 2.3-2.5 (m, 4 H), 2.8-3.0 (m, 4 H), 3.39 (s, 2 H), 5.31 (s, 2 H), 6.8-6.95 (m, 4 H), 6.95-7.0 (m, 2 H), 7.1-7.3 (m, 2 H), 7.55 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1 H), 7.63 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1 H), 8.26 (s, 1 H), 8.34 (s, 1 H).

化合物 36 {2-(ベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-モルホリノメチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

$^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.2-2.4 (m, 4 H), 2.8-3.0 (m, 4 H), 3.27 (s, 2 H), 3.5-3.6 (m, 4 H), 5.30 (s, 2 H), 6.7-7.1 (m, 6 H), 7.1-7.25 (m, 2 H), 7.54 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1 H), 7.62 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1 H), 8.28 (s, 1 H), 8.34 (s, 1 H).

化合物 4 1 {2-(2-フェニルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン・1シュウ酸塩}

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.2-2.5 (m, 2 H), 2.7-3.0 (m, 4 H), 3.0-3.2 (m, 2 H), 3.4-3.6 (m, 2 H), 4.05 (s, 2 H), 5.45 (s, 2 H), 5.69 (m, 1 H), 5.85 (m, 1 H), 6.6-6.8 (m, 2 H), 6.88 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1 H), 6.97 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H), 7.05-7.2 (m, 2 H), 7.2-7.5 (m, 2 H), 7.5-7.7 (m, 4 H), 7.7-7.85 (m, 3 H), 8.54 (s, 1 H).

化合物 4 2 {2-(2-フェニルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-(ピロリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン・1シュウ酸塩}

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.8-2.0 (m, 4 H), 2.8-3.0 (m, 4 H), 3.0-3.2 (m, 4 H), 4.12 (s, 2 H), 5.45 (s, 2 H), 6.6-6.7 (m, 2 H), 6.88 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H), 6.96 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1 H), 7.1-7.2 (m, 2 H), 7.2-7.3 (m, 2 H), 7.4-7.6 (m, 4 H), 7.6-7.8 (m, 3 H), 8.53 (s, 1 H).

化合物 4 8 {2-モルホリノメチル-8-(2-フェニルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン・1シュウ酸塩}

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.7-3.0 (m, 8 H), 3.6-3.8 (m, 4 H), 3.83 (s, 2 H), 5.42 (s, 2 H), 6.65-6.7 (m, 2 H), 6.85 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H), 6.92 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H), 7.0-7.1 (m, 2 H), 7.2-7.3 (m, 2 H), 7.4-7.6 (m, 4 H), 7.65-7.8 (m, 3 H), 8.44 (s, 1 H).

化合物 5 3 {2-(2-メチルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.0-2.1 (m, 2 H), 2.45 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2 H),

2.54 (s, 3 H), 2.75-2.85 (m, 2 H), 2.85-3.0 (m, 4 H), 3.35 (s, 2 H), 5.28 (s, 2 H), 5.55-5.75 (m, 2 H), 6.8-7.0 (m, 6 H), 7.1-7.2 (m, 2 H), 7.4-7.6 (m, 2 H), 8.28 (s, 1 H).

化合物 54 {2-(2-メチルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-(ピロリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.5-1.8 (m, 4 H), 2.3-2.5 (m, 4 H), 2.54 (s, 3 H), 2.8-3.0 (m, 4 H), 3.39 (s, 2 H), 5.28 (s, 2 H), 6.7-6.9 (m, 6 H), 7.1-7.2 (m, 2 H), 7.3-7.5 (m, 2 H), 8.25 (s, 1 H).

化合物 60 {2-(2-メチルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-モルホリノメチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.2-2.4 (m, 4 H), 2.49 (s, 3 H), 2.8-3.0 (m, 4 H), 3.28 (s, 2 H), 3.5-3.6 (m, 4 H), 5.28 (s, 2 H), 6.8-7.0 (m, 6 H), 7.1-7.2 (m, 2 H), 7.5-7.6 (m, 2 H), 8.28 (s, 1 H).

化合物 65 {2-(5,6-ジメチルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.0-2.1 (m, 2 H), 2.2-2.4 (m, 6 H), 2.45 (t,  $J = 5.2$  Hz, 2 H), 2.75-2.85 (m, 2 H), 2.85-3.05 (m, 4 H), 3.30 (s, 2 H), 5.24 (s, 2 H), 5.6-5.7 (m, 2 H), 6.8-7.0 (m, 6 H), 7.31 (s, 1 H), 7.40 (s, 1 H), 8.17 (s, 1 H), 8.27 (s, 1 H).

化合物 66 {2-(5,6-ジメチルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-(ピロリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.5-1.8 (m, 4 H), 2.27 (s, 3 H), 2.28 (s, 3 H), 2.3-2.4 (m, 4 H), 2.8-3.0 (m, 4 H), 3.39 (s, 2 H), 5.24 (s, 2 H), 6.8-7.0



(m, 6 H), 7.30 (s, 1 H), 7.40 (s, 1 H), 8.16 (s, 1 H), 8.24 (s, 1 H).

化合物 7 2 {2-(5,6-ジメチルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-  
-モルホリノメチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.2-2.4 (m, 10 H), 2.8-3.0 (m, 4 H), 3.28 (s, 2 H), 3.5-3.6 (m, 4 H), 5.24 (s, 2 H), 6.8-7.0 (m, 6 H), 7.30 (s, 1 H), 7.39 (s, 1 H), 8.16 (s, 1 H), 8.28 (s, 1 H).

化合物 7 7 {2-(2-エチルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-  
(1,2,5,6-テトラヒドロピリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-  
-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.28 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 1.95-2.05 (m, 2 H), 2.43 (t,  $J = 5.4$  Hz, 2 H), 2.6-3.0 (m, 8 H), 3.32 (s, 2 H), 5.28 (s, 2 H), 5.1-5.5 (m, 2 H), 6.75-7.0 (m, 6 H), 7.1-7.25 (m, 2 H), 7.47 (m, 1 H), 7.55 (m, 1 H), 8.26 (s, 1 H).

化合物 7 8 {2-(2-エチルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-(ピ  
ロリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピ  
ン}

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.28 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 1.6-1.8 (m, 4 H), 2.3-2.4 (m, 4 H), 2.8-3.0 (m, 6 H), 3.32 (s, 2 H), 5.28 (s, 2 H), 6.7-7.0 (m, 6 H), 7.0-7.2 (m, 2 H), 7.46 (m, 1 H), 7.54 (m, 1 H), 8.23 (s, 1 H).

化合物 8 4 {2-(2-エチルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-モルホリ  
ノメチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.28 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 2.2-2.4 (m, 4 H), 2.8-3.0 (m, 6 H), 3.27 (s, 2 H), 3.5-3.6 (m, 4 H), 5.27 (s, 2 H), 6.7-7.0 (m, 6 H), 7.1-7.2 (m, 2 H), 7.47 (m, 1 H), 7.55 (m, 1 H), 8.26 (s, 1 H).

化合物 88～化合物 90 の構造を第 7 表に、分析値 (APCI-MS、 $^1\text{H}$  NMR) を以下に示した。

化合物 88 {2-(イミダゾ[4,5-b]ピリジン-1-イルメチル)-8-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

APCI-MS:  $m/z$  422 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.0-2.1 (m, 2 H), 2.44 (t,  $J = 5.4$  Hz, 2 H), 2.75-2.8 (m, 2 H), 2.8-3.0 (m, 4 H), 3.30 (s, 2H), 5.33 (s, 2 H), 5.5-5.6 (m, 2 H), 6.8-7.0 (m, 4 H), 7.0-7.05 (m, 2 H), 7.27 (dd,  $J = 4.7$  Hz, 8.0 Hz, 1 H), 8.06 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1 H), 8.27 (s, 1 H), 8.37 (d,  $J = 4.7$  Hz, 1 H), 8.54 (s, 1 H).

化合物 89 {2-(イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン・1シユウ酸塩}

APCI-MS:  $m/z$  422 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.2-2.3 (m, 2 H), 2.9-3.0 (m, 4 H), 3.4-3.5 (m, 2 H), 3.60 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2 H), 4.05 (s, 2 H), 5.37 (s, 2 H), 5.67 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1 H), 5.85 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1 H), 6.9-7.0 (m, 2 H), 7.0-7.1 (m, 4 H), 7.25 (dd,  $J = 5.4, 8.1$  Hz, 1 H), 8.01 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H), 8.40 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1 H), 8.55 (s, 1 H), 8.62 (s, 1 H).

化合物 90 {2-(イミダゾ[4,5-c]ピリジン-1-イルメチル)-8-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

APCI-MS:  $m/z$  422 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.1-2.2 (m, 2 H), 2.56 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2 H), 2.8-2.9 (m, 2 H), 3.0-3.1 (m, 4 H), 3.48 (s, 2H), 5.30 (s, 2 H), 5.67 (d,  $J$

= 10.5 Hz, 1 H), 5.73 (d, J = 10.5 Hz, 1 H), 6.08 (s, 1 H), 6.65-6.75 (m, 2 H), 6.95-7.0 (m, 2 H), 7.0-7.05 (m, 2 H), 7.71 (d, J = 5.4 Hz, 1 H), 8.02 (s, 1 H), 8.45 (d, J = 5.4 Hz, 1 H), 8.78 (s, 1 H).

参考例 22 : N-メチル-N-(2-トリチル-2H-テトラゾール-5-イルメチル)アミンの合成

2-トリチル-2H-テトラゾール-5-イルメタノール (2.00 g, 5.84 mmol)、N-メチル-2-ニトロベンゼンスルホンアミド (1.64 g, 7.59 mmol) およびトリフェニルホスフィン (1.53 g, 5.84 mmol) をテトラヒドロフラン (30 mL) およびトルエン (20 mL) の混合溶媒に溶解し、アゾジカルボン酸ジエチルトルエン溶液 (40%, 2.65 mL, 5.84 mmol) を加えて室温で終夜撹拌した。シリカゲルを通過 (溶出溶媒: 酢酸エチル/ヘキサン=40/60) させて原点成分を除去した後、減圧下濃縮し、残渣にアセトン (5 mL) とアセトニトリル (25 mL) を加えた。

得られた懸濁液にメルカプト酢酸 (0.73 mL, 11 mmol) と1,8-ジアザビシクロ[5,4,0]ウンデック-7-エン (3.1 mL, 21 mmol) を加えて60°Cで7時間撹拌した。反応液を濃縮し、残渣を酢酸エチルに溶解した。得られた溶液を飽和重曹水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: トリエチルアミン/酢酸エチル=1/99) で精製し、N-メチル-N-(2-トリチル-2H-テトラゾール-5-イルメチル)アミン (396 mg, 1.11 mmol, 収率19.0%) を得た。

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.45 (s, 3 H), 4.07 (s, 2 H), 7.07-7.36 (m, 15 H).

参考例 23 : 化合物 92 {酢酸[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]エステル} の合成

参考例 6 で得られた化合物 13 (7.98 g, 13.1 mmol) をジメチルスルホキシド (87 mL) に溶解し、酢酸リチウム (4.33 g, 65.7 mL) を加えて70°C

で2日間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水(3回)、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(溶出溶媒:酢酸エチル)で精製し、目的物を含む画分を濃縮し、残渣にエタノールを加えて得られる懸濁液を室温で0.5時間攪拌した。析出した結晶を濾取し、化合物92(2.87 g, 6.31 mmol, 収率 48%)を得た。

APCI-MS:  $m/z$  455 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.06 (s, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.62 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 4.98 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.13 (s, 1 H), 6.58-6.83 (m, 4 H), 6.88 (s, 1 H), 7.01-7.07 (m, 2 H).

参考例24: 化合物93 {[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イル]メタノール}の合成

参考例23で得られた化合物92(2.79 g, 6.14 mmol)をテトラヒドロフラン(61 mL)に懸濁させ、ナトリウムメトキシド/メタノール溶液(28%, 6.2 mL, 31 mmol)を加えて室温で3.5時間攪拌した。反応の進行を薄層クロマトグラフィーで確認した後、反応液に水を加えて室温にて0.5時間攪拌した。析出した結晶を濾取し、減圧下乾燥させた後、エタノールに懸濁させ、加熱還流条件下、1時間攪拌し、さらに室温で1時間攪拌した。析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥させ、化合物93(2.04 g, 4.95 mmol, 収率81%)を得た。

APCI-MS:  $m/z$  413 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 1.56 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 4.55 (d,  $J = 5.6$  Hz, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.03 (s, 1 H), 6.59-6.85 (m, 3 H), 6.88 (s, 1 H), 7.03 (m, 2 H).

参考例25: 化合物94 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ

[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-メトキシメチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

水素化ナトリウム (55%, 11 mg, 0.25 mmol) のテトラヒドロフラン (0.40 mL) 懸濁液にメタノール (20  $\mu$ L, 0.50 mmol) を加えて室温で20分間攪拌した。その後、反応液をテトラヒドロフラン (0.20 mL) に懸濁した参考例 6 で得られた化合物 13 (30 mg, 0.050 mmol) に加え、60°Cで3.5時間反応させた。反応液を濃縮した後、残渣をクロロホルムに溶解し、得られた溶液を水と飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: 酢酸エチル/ヘキサン/トリエチルアミン=45/50/5) で精製して、化合物 94 (6.5 mg, 15  $\mu$ mol, 収率30%) を得た。

APCI-MS: m/z 427 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.36 (s, 3 H), 4.32 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.09 (s, 1 H), 6.58-6.82 (m, 4 H), 6.88 (s, 1 H), 7.01 (m, 2 H).

参考例 26: 化合物 95 {2-アリルオキシメチル-8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

メタノールの代わりにアリルアルコールを用い、参考例 25 と同様にして、収率34%で化合物 95 を得た。

APCI-MS: m/z 453 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.80 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 4.00 (dt,  $J = 5.6, 1.5$  Hz, 2 H), 4.39 (s, 2 H), 5.19 (dq,  $J = 10.2, 1.5$  Hz, 1 H), 5.29 (dq,  $J = 17.0, 1.5$  Hz, 1 H), 5.34 (s, 2 H), 5.95 (m, 1 H), 6.10 (s, 1 H), 6.58-6.83 (m, 4 H), 6.88 (s, 1 H), 7.03 (m, 2 H).

参考例 27: 化合物 96 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ

[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(2-メトキシエトキシメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

メタノールの代わりに2-メトキシエタノールを用い、参考例25と同様にして、収率9.3%で化合物96を得た。

APCI-MS: m/z 495 ([M + H]<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 1.30 (t, J = 7.5 Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.80 (q, J = 7.5 Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.38 (s, 3 H), 3.57 (m, 4 H), 4.44 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.01 (s, 1 H), 6.62 (d, J = 8.6 Hz, 1 H), 6.67 (d, J = 8.1 Hz, 1 H), 6.82 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 7.00-7.06 (m, 2 H).

参考例28: 化合物97 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(2,2,2-トリフルオロエトキシメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

メタノールの代わりに2,2,2-トリフルオロエタノールを用い、参考例25と同様にして、収率64%で化合物97を得た。

APCI-MS: m/z 495 ([M + H]<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 1.30 (t, J = 7.6 Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q, J = 7.6 Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.78 (q, J = 8.7 Hz, 2 H), 4.54 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.24 (s, 1 H), 6.60 (d, J = 7.8 Hz, 1 H), 6.71 (d, J = 8.1 Hz, 1 H), 6.76-6.82 (m, 2 H), 6.89 (s, 1 H), 6.98-7.04 (m, 2 H).

参考例29: 化合物98 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(2-メチルプロポキシメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

メタノールの代わりに2-メチル-1-プロパノールを用い、参考例25と同様にして、収率11%で化合物98を得た。

APCI-MS: m/z 469 ([M + H]<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0.91 (d, J = 6.7 Hz, 6 H), 1.30 (t, J = 7.4 Hz,

3 H), 1.89 (m, 1 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q, J = 7.4 Hz, 2 H), 2.99 (m, 4 H), 3.20 (d, J = 6.5 Hz, 2 H), 4.37 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.01 (s, 1 H), 6.60 (d, J = 8.9 Hz, 1 H), 6.67 (d, J = 7.8 Hz, 1 H), 6.81 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.98-7.05 (m, 2 H).

参考例 30 : 化合物 99 {2-ベンジルオキシメチル-8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

メタノールの代わりにベンジルアルコールを用い、参考例 25 と同様にして、収率78%で化合物 99 を得た。

APCI-MS: m/z 503 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t, J = 7.5 Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.62 (s, 2 H), 2.79 (q, J = 7.5 Hz, 2 H), 2.97 (m, 4 H), 4.42 (s, 2 H), 4.53 (s, 2 H), 5.33 (s, 2 H), 6.20 (s, 1 H), 6.59 (d, J = 7.9 Hz, 1 H), 6.69 (d, J = 7.9 Hz, 1 H), 6.78 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 7.02 (m, 2 H), 7.26-7.36 (m, 5 H).

参考例 31 : 化合物 100 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(2-フェニルエトキシメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

メタノールの代わりに2-フェニルエタノールを用い、参考例 25 と同様にして、収率38%で化合物 100 を得た。

APCI-MS: m/z 517 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t, J = 7.5 Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.80 (q, J = 7.5 Hz, 2 H), 2.91 (t, J = 7.2 Hz, 2 H), 2.97 (m, 4 H), 3.66 (t, J = 7.2 Hz, 2 H), 4.39 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.08 (s, 1 H), 6.60 (d, J = 8.7 Hz, 1 H), 6.66 (d, J = 8.1 Hz, 1 H), 6.80 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.94-7.01 (m, 2 H), 7.19-7.30 (m, 5 H).

参考例 32 : 化合物 101 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ

[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(ピリジン-2-イルメトキシメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

メタノールの代わりにピリジン-2-イルメタノールを用い、参考例 25 と同様にして、収率65%で化合物 101 を得た。

APCI-MS: m/z 504 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.80 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 4.52 (s, 2 H), 4.66 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.25 (s, 1 H), 6.60 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H), 6.70 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H), 6.76-6.81 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 7.03-7.08 (m, 2 H), 7.18 (br dd,  $J = 7.6, 4.8$  Hz, 1 H), 7.47 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H), 7.68 (td,  $J = 7.7, 1.8$  Hz, 1 H), 8.54 (br d,  $J = 4.8$  Hz, 1 H).

参考例 33 : 化合物 102 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(フラン-2-イルメトキシメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

メタノールの代わりにフラン-2-イルメタノールを用い、参考例 25 と同様にして、収率77%で化合物 102 を得た。

APCI-MS: m/z 493 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.62 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.97 (m, 4 H), 4.41 (s, 2 H), 4.45 (s, 2 H), 5.33 (s, 2 H), 6.21 (br s, 1 H), 6.31 (dd,  $J = 3.1, 0.8$  Hz, 1 H), 6.33 (dd,  $J = 3.1, 1.8$  Hz, 1 H), 6.58 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H), 6.69 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H), 6.75-6.80 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 7.00-7.04 (m, 2 H), 7.40 (dd,  $J = 1.8, 0.8$  Hz, 1 H).

参考例 34 : 化合物 103 {8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボニトリル} の合成

参考例 15 の工程 1 で得られた8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベン



ゾ[b,f]アゼピン-2-カルボアルデヒド (650 mg, 1.58 mmol) をアセトニトリル(16 mL)に懸濁させ、ヒドロキシルアミン塩酸塩(153 mg, 2.38 mmol)、トリエチルアミン (0.331 mL, 2.38 mmol) およびフタル酸無水物 (328 mg, 2.21 mmol) を加えて80°Cで終夜撹拌した。反応液を濃縮し、残渣をクロロホルムに溶解し、得られた溶液をアンモニア水 (3%) と飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: メタノール/クロロホルム=1/99) で精製し、目的物を含む画分を濃縮した。残渣にエタノールを加え、得られた懸濁液を60°Cで0.5時間撹拌し、室温で1時間撹拌した。析出した結晶を濾取し、減圧下乾燥して、化合物 1 0 3 (440 mg, 1.08 mmol, 収率68%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  408 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.31 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 5.36 (s, 2 H), 6.48 (s, 1 H), 6.63-6.90 (m, 5 H), 7.28-7.33 (m, 2 H).

参考例 3 5 : 化合物 1 0 4 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(2H-テトラゾール-5-イル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

参考例 3 4 で得られた化合物 1 0 3 を用い、参考例 2 0 の後段と同様にして、収率72%で化合物 1 0 4 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  451 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.24 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 2.48-2.53 (s x 2, 6 H, DMSOとオーバーラップ), 2.80 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2 H), 2.86-3.02 (m, 4 H), 5.32 (s, 2 H), 6.83 (dd,  $J = 8.1, 2.1$  Hz, 1 H), 6.91-6.98 (m, 3 H), 7.10 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1 H), 7.65-7.70 (m, 2 H), 8.20 (s, 1 H).

参考例 3 6 : 化合物 1 0 5 {[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イル]アセトニトリル} の合成

参考例 6 で得られた化合物 1 3 (2.04 g, 3.36 mmol) をジメチルホルム

アミド (17 mL) に溶解して、青酸ナトリウム (361 mg, 7.37 mmol) を加え、50°Cで10時間攪拌した。反応液を室温まで冷却し、酢酸エチルで希釈し、2mol/L水酸化ナトリウム水溶液、水 (2回)、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をエタノールから再結晶し、化合物 105 (751 mg, 1.78 mmol, 収率53%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  422 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.31 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.99 (m, 4 H), 3.62 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.01 (s, 1 H), 6.59-6.71 (m, 2 H), 6.80-6.84 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.95-7.01 (m, 2 H).

参考例 37: 化合物 106 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(2H-テトラゾール-5-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

参考例 36 で得られた化合物 105 を用い、参考例 20 の後段と同様にし、収率76%で化合物 106 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  465 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.22 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 2.48-2.52 (s x 2, 6 H, DMSOとオーバーラップ), 2.78 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.86 (m, 4 H), 4.11 (s, 2 H), 5.28 (s, 2 H), 6.75-6.94 (m, 7 H), 8.32 (br s, 1 H).

参考例 38: 化合物 107 {[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イル]酢酸} の合成

参考例 36 で得られた化合物 105 (247 mg, 0.586 mmol) をエタノール (12 mL) に懸濁し、水酸化ナトリウム (938 mg, 23.5 mmol) を加えて、加熱還流条件下、3時間攪拌した。反応の進行を薄層クロマトグラフィーで確認した後、反応液を室温まで冷却し、1mol/L塩酸でpHを 5に調整した。析出した結晶を濾取し、減圧下乾燥した後、エタノールに懸濁し、60°Cで0.5時間攪拌し、室温で1時間攪拌した。析出した結晶を濾取し、減圧下乾燥して、

化合物 107 (122 mg, 0.243 mmol, 収率41%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  441 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.23 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.48-2.53 (s x 2, 6 H, DMSOとオーバーラップ), 2.78 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.87 (br s, 4 H), 3.38 (s, 2 H), 5.38 (s, 2 H), 6.74-6.94 (m, 7 H), 8.27 (s, 1 H), 12.15 (br s, 1 H).

参考例 39 : 化合物 108 {[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチルスルファニル]酢酸メチルエステル} の合成

参考例 6 で得られた化合物 13 (1.04 g, 1.71 mmol) をクロロホルム (17 mL) に溶解して、メルカプト酢酸メチルエステル (0.199 mL, 2.23 mmol) および 1,8-ジアザビシクロ[5,4,0]ウンデック-7-エン (0.384 mL, 2.57 mmol) を加え、40°C で 7 時間攪拌した。反応液を濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(溶出溶媒:メタノール/クロロホルム=1/99)で精製し、化合物を含む画分を濃縮した。残渣にエタノールを加え、得られた懸濁液を 60°C で 0.5 時間、室温で 1 時間攪拌した。析出した結晶を濾取して、化合物 108 (628 mg, 1.25 mmol, 収率73%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  501 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.80 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.09 (s, 2 H), 3.72 (s, 3 H), 3.73 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.01 (s, 1 H), 6.59-6.67 (m, 2 H), 6.82 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.96-7.03 (m, 2 H).

参考例 40 : 化合物 109 {[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチルスルファニル]酢酸} の合成

参考例 39 で得られた化合物 108 (350 mg, 0.699 mmol) を用い、参考例 12 と同様にして、収率38%で化合物 109 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  487 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.16 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 2.42-2.50 (s x 2, 6 H, DMSOとオーバーラップ), 2.81 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2 H), 2.88 (m, 6 H), 3.49 (s, 2 H), 5.22 (s, 2 H), 6.67-6.89 (m, 7 H), 8.18 (s, 1 H).

参考例 41: 化合物 110 {8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸エチルエステル} の合成

#### 工程 1

ヨウ化1-(10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル)-1-メチルピペリジニウム (6.68 g, 15.4 mmol) をジメチルスルホキシド (110 mL) に溶解し、酢酸リチウム (5.07 g, 76.9 mmol) を加えて、70°Cで2日間攪拌した。反応溶液を酢酸エチルで希釈し、水 (3回) と飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: 酢酸エチル/ヘキサン=30/70) で精製して、酢酸 (10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル) エステル (2.85 g, 10.7 mmol, 収率69%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  268 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.07 (s, 3 H), 3.07 (br s, 4 H), 4.99 (s, 2 H), 6.05 (br s, 1 H), 6.66-6.85 (m, 3 H), 7.02-7.11 (m, 4 H).

#### 工程 2

工程 1 で得られた酢酸 (10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル) エステル (2.85 g, 10.7 mmol) をメタノール (110 mL) に懸濁して、ナトリウムメトキシド/メタノール溶液 (38%, 1.14 mL, 5.36 mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。反応溶液を濃縮し、残渣に飽和食塩水とクロロホルムを加え、3回クロロホルムで抽出した。有機層を合わせ、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をジイソプロピルエーテルから再結晶して、10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメタノール (1.73 g, 7.68 mmol, 収率72%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  226 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.49 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1 H), 3.08 (br s, 4 H), 4.57

(d,  $J = 5.8$  Hz, 2 H), 6.02 (br s, 1 H), 6.66-6.87 (m, 3 H), 7.02-7.11 (m, 4 H).

#### 工程 3

工程 2 で得られた 10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメタノール (6.1 g, 70 mmol) をクロロホルム (77 mL) に溶解して、二酸化マンガン (4.55 g, 46.1 mmol) を加え、室温で 8 時間攪拌した。反応溶液をセライトを通じて濾過し、濾液を濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: 酢酸エチル/ヘキサン=20/80) で精製して、10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボアルデヒド (1.15 g, 5.15 mmol, 収率 67%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  224 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 3.11 (m, 4 H), 6.49 (br s, 1 H), 6.87-6.91 (m, 3 H), 7.07-7.17 (m, 2 H), 7.55-7.62 (m, 2 H), 9.88 (s, 1 H).

#### 工程 4

工程 3 で得られた 10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボアルデヒド (665 mg, 2.98 mmol) をアセトニトリル (18 mL) および水 (18 mL) の混合溶媒に溶解して、ジメチルスルホキシド (2.1 mL, 30 mmol)、リン酸 2 水素ナトリウム (1.43 g, 11.9 mmol) および亜塩素酸ナトリウム (404 mg, 4.47 mmol) を加え、50°C で 4 時間攪拌した。反応溶液に酢酸エチルと水を加え、酢酸エチルで 2 回抽出した。有機層を合わせ、水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣に酢酸エチルとヘキサンの混合溶媒 (3 : 1) を加え、得られる懸濁液を 60°C で 0.5 時間攪拌し、室温で 1 時間攪拌した。析出した結晶を濾取して、10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸 (598 mg, 2.50 mmol, 収率 84%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  240 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 3.11 (m, 4 H), 6.39 (br s, 1 H), 6.77-6.80 (m, 3 H), 7.06-7.16 (m, 2 H), 7.79-7.84 (m, 2 H).

#### 工程 5

工程 4 で得られた 10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸 (426 mg, 1.78 mmol) をエタノール (8.9 mL) に溶解して、塩化

チオニル (0.26 mL, 3.6 mmol) を加え、加熱還流条件下、5時間攪拌した。反応溶液を濃縮し、クロロホルムと飽和重曹水を加え、クロロホルムで3回抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: 酢酸エチル/ヘキサン=10/90) で精製して、10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸エチルエステル (383 mg, 1.43 mmol, 収率 81%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  268 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.37 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3 H), 3.09 (m, 4 H), 4.33 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2 H), 6.34 (br s, 1 H), 6.69-6.86 (m, 3 H), 7.04-7.14 (m, 2 H), 6.72-6.78 (m, 2 H).

#### 工程 6

工程 5 で得られた 10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸エチルエステル (443 mg, 1.66 mmol) をクロロホルム (8.3 mL) および酢酸 (8.3 mL) の混合溶媒に溶解し、ピペリジン (0.573 mL, 5.80 mmol) およびパラホルムアルデヒド (149 mg, 4.97 mmol) を加え、60°C に加熱し、1.5 日間攪拌した。反応液を濃縮し、残渣に酢酸エチルと飽和重曹水を加えて、酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: 酢酸エチル/ヘキサン/トリエチルアミン=70/25/5) で精製し、目的物を含む画分を濃縮した。残渣をジエチルエーテルでトリチュレーションし、8-ピペリジノメチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸エチルエステル (249 mg, 0.683 mmol, 収率 41%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  365 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.34-1.46 (m, 5 H), 1.67 (m, 4 H), 2.36 (br s, 4 H), 3.08 (m, 4 H), 3.38 (s, 2 H), 4.33 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2 H), 6.32 (s, 1 H), 6.67-6.74 (m, 2 H), 6.99-7.06 (m, 2 H), 7.72-7.76 (m, 2 H).

#### 工程 7

工程 6 で得られた 8-ピペリジノメチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸エチルエステル (231 mg, 0.634 mmol) を

ジクロロメタン (3.2 mL) に溶解して、ヨウ化メチル (59.2  $\mu$ L, 0.951 mmol) を加え、室温で終夜撹拌した。反応溶液を減圧下濃縮して、ヨウ化1-(8-エトキシカルボニル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル)-1-メチルピペリジニウム (321mg, 0.634 mmol, 収率100%) を得た。

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.37 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3 H), 1.75-1.95 (m, 6 H), 2.96 (br s, 4 H), 3.11 (s, 3 H), 3.50 (m, 2 H), 3.70 (m, 2 H), 4.32 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2 H), 4.90 (s, 2 H), 7.14-7.35 (m, 4 H), 7.49 (s, 1 H), 7.71 (m, 2 H).

#### 工程 8

2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン (180 mg, 1.03 mmol) をジメチルホルムアミド (0.60 mL) に溶解し、撹拌しながら水素化ナトリウム (55%, 33.6 mg, 0.770 mmol) を数回に分けて加えた後、50°C で0.5時間撹拌した。反応液を室温まで冷却し、ジメチルホルムアミド (1.2 mL) に溶解した工程7で得られたヨウ化1-(8-エトキシカルボニル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル)-1-メチルピペリジニウム (130 mg, 0.256 mmol) を加え、室温で1時間撹拌した。反応溶液を酢酸エチルで希釈し、水、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: メタノール/クロロホルム=1/99) で精製し、目的物を含む画分を濃縮した。残渣にジエチルエーテルを加え、加熱還流条件で0.5時間撹拌し、その後室温で1時間で撹拌した。析出した結晶を濾取して、化合物 110 (76.7mg, 0.169 mmol, 収率66%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  455 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.31 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 1.36 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.80 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.97 (m, 2 H), 3.40 (m, 2 H), 4.32 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2 H), 5.36 (s, 2 H), 6.35 (s, 1 H), 6.64-6.71 (m, 2 H), 6.82-6.90 (m, 3 H), 7.70-7.74 (m, 2 H).

参考例 42: 化合物 111 {8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ

[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸} の合成

参考例 4 1 で得られた化合物 1 1 0 (900 mg, 1.98 mmol) を用い、参考例 1 2 と同様にして、収率 97% で化合物 1 1 1 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  427 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.24 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.51-2.54 (s x 2, 6 H, DMSO とオーバーラップ), 2.82-2.99 (m, 6 H), 5.37 (s, 2 H), 6.84-7.03 (m, 5 H), 7.58 (m, 2 H), 8.87 (br s, 1 H), 12.25 (br s, 1 H).

参考例 4 3 : 化合物 1 1 2 {[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イル](4-メチルピペラジン-1-イル)メタノン} の合成

参考例 4 2 で得られた化合物 1 1 1 (100 mg, 0.234 mmol) をジメチルホルムアミド (2.3 mL) およびテトラヒドロフラン (4.6 mL) の混合溶媒に溶解し、これに 4-メチルピペラジン (39  $\mu\text{L}$ , 0.352 mmol)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド・1塩酸塩 (89.7 mg, 0.468 mmol) および 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (35.8 mg, 0.234 mmol) を加えて室温で 8 時間攪拌した。反応の進行を薄層クロマトグラフィーで確認した後、反応液を濃縮した。残渣をクロロホルムに溶解し、得られた溶液を水 (2 回)、飽和重曹水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣にジエチルエーテルを加え、得られる懸濁液を室温で 1 時間攪拌した後、固体を濾取して、化合物 1 1 2 (47.7 mg, 0.0938 mmol, 収率 40%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  509 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.31 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.33 (s, 3 H), 2.43 (br s, 4 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.80 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.99 (m, 4 H), 3.66 (br s, 4 H), 5.35 (s, 2 H), 6.18 (s, 1 H), 6.62-6.69 (m, 2 H), 6.83 (m, 2 H), 6.85 (s, 1 H), 7.10-7.15 (m, 2 H).



参考例 4 4 : 化合物 1 1 3 {[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イル](ピロリジン-1-イル)メタノン} の合成

4-メチルピペラジンの代わりにピロリジンを用い、参考例 4 3 と同様にして、収率90%で化合物 1 1 3 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  480 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.31 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 1.88 (br s, 4 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.80 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.99 (m, 4 H), 3.56 (m, 4 H), 5.35 (s, 2 H), 6.19 (s, 1 H), 6.62-6.69 (m, 2 H), 6.81-6.86 (m, 2 H), 6.89 (s, 1 H), 7.24-7.29 (m, 2 H).

参考例 4 5 : 化合物 1 1 4 {[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イル](4-ヒドロキシピペリジノ)メタノン} の合成

4-メチルピペラジンの代わりに4-ピペリジノールを用い、参考例 4 3 と同様にして、収率62%で化合物 1 1 4 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  510 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.31 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3 H), 1.48-1.58 (m, 2 H), 1.86-1.97 (m, 2 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 2 H), 2.80 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2 H), 2.99 (m, 4 H), 3.22-3.33 (m, 2 H), 3.91-4.00 (m, 3 H), 5.36 (s, 2 H), 6.21 (s, 1 H), 6.62-6.70 (m, 2 H), 6.81-6.85 (m, 2 H), 6.89 (s, 1 H), 7.08-7.14 (m, 2 H).

参考例 4 6 : 化合物 1 1 5 {8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸(2-ヒドロキシエチル)アミド} の合成

4-メチルピペラジンの代わりにエタノールアミンを用い、参考例 4 3 と同様にして、収率82%で化合物 1 1 5 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  470 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.31 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 1.71 (br s, 1 H), 2.60

(s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q, J = 7.5 Hz, 2 H), 2.97 (m, 4 H), 3.59 (m, 2 H), 3.81 (t, J = 9.6 Hz, 2 H), 5.35 (s, 2 H), 6.41 (s, 1 H), 6.54 (t, J = 5.6 Hz, 1 H), 6.63-6.71 (m, 2 H), 6.80-6.84 (m, 2 H), 6.99 (s, 1 H), 7.44-7.48 (m, 2 H).

参考例 47 : 化合物 116 {8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸[2-(ピロリジン-1-イル)エチル]アミド} の合成

4-メチルピペラジンの代わりに2-(ピロリジン-1-イル)エチルアミンを用い、参考例 43 と同様に、収率92%で化合物 116 を得た。

APCI-MS: m/z 523 ([M + H]<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 1.31 (t, J = 7.6 Hz, 3 H), 1.78 (m, 4 H), 1.57 (m, 4 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.70 (t, J = 5.9 Hz, 2 H), 2.79 (q, J = 7.6 Hz, 2 H), 2.97 (m, 2 H), 3.04 (m, 2 H), 3.53 (q, J = 5.7 Hz, 2 H), 5.35 (s, 2 H), 6.30 (s, 1 H), 6.63-6.72 (m, 3 H), 6.83 (m, 2 H), 6.89 (s, 1 H), 7.45-7.52 (m, 2 H).

参考例 48 : 化合物 117 {[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イル](モルホリノ)メタノン} の合成

4-メチルピペラジンの代わりにモルホリンを用い、参考例 43 と同様に、収率98%で化合物 117 を得た。

APCI-MS: m/z 496 ([M + H]<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 1.31 (t, J = 7.5 Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.80 (q, J = 7.5 Hz, 2 H), 2.99 (m, 4 H), 3.66 (m, 8 H), 5.35 (s, 2 H), 6.22 (s, 1 H), 6.62-6.71 (m, 2 H), 6.81-6.86 (m, 2 H), 6.89 (s, 1 H), 7.10-7.16 (m, 2 H).

参考例 49 : 化合物 118 {8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ

[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸[ビス(2-ヒドロキシエチル)]アミド} の合成

4-メチルピペラジンの代わりに2-(2-ヒドロキシエチルアミノ)エタノールを用い、参考例43と同様にして、収率38%で化合物118を得た。

APCI-MS:  $m/z$  514 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.21 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.80 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.23 (br s, 2 H), 3.63 (br s, 4 H), 3.87 (br s, 4 H), 5.35 (s, 2 H), 6.20 (s, 1 H), 6.62-6.69 (m, 2 H), 6.83 (m, 2 H), 6.89 (s, 1 H), 7.24-7.29 (m, 2 H).

参考例50: 化合物119 {8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸アミド} の合成

4-メチルピペラジンの代わりにアンモニアを用い、参考例43と同様にして、収率57%で化合物119を得た。

APCI-MS:  $m/z$  426 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.23 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 2.48-2.52 (s x 2, 6H, DMSOとオーバーラップ), 2.78 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2 H), 2.92 (br q,  $J = 7.3$  Hz, 4 H), 5.31 (s, 2 H), 6.78-7.00 (m, 6 H), 7.52-7.65 (m, 3 H), 8.68 (s, 1 H).

参考例51: 化合物120 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-8-(ピロリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

参考例3で得られた化合物3 (400 mg, 0.876 mmol) を酢酸 (8.8 mL) に溶解し、パラホルムアルデヒド (0.47 g, 16 mmol) およびシアノ水素化ホウ素ナトリウム (2.2 g, 10 mmol) を加えて室温で5時間撹拌した。反応溶液にクロロホルムと飽和重曹水を加え、水層をクロロホルムで2回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をNH-シリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: クロロホルム/ヘキサ

ン=50/50)で精製して、化合物120 (342 mg, 0.713 mmol, 収率81%)を得た。

APCI-MS:  $m/z$  480 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.31 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 1.76 (m, 4 H), 2.47 (m, 4 H), 2.58 (s, 3 H), 2.62 (s, 3 H), 2.78 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 3.06 (m, 4 H), 3.29 (s, 3 H), 3.50 (s, 2 H), 5.35 (s, 2 H), 6.83-6.98 (m, 5 H), 7.02-7.08 (m, 2 H).

参考例52: 化合物121 {1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]ピペリジン-4-カルボン酸}の合成

#### 工程1

参考例9で得られた化合物16 (1.20 g, 2.18 mmol) を酢酸 (10 mL) に溶解し、バラホルムアルデヒド (0.73 g, 21.8 mmol) およびシアノ水素化ホウ素ナトリウム (0.58 g, 8.70 mmol) を加えて室温で15時間攪拌した。反応溶液に酢酸エチルと1mol/L水酸化ナトリウム水溶液を加え、水層を酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣をNH-シリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: ヘキサン-酢酸エチル混合溶媒) で精製して、1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]ピペリジン-4-カルボン酸エチルエステル (1.25 g, 2.18 mmol, 収率100%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  566 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.23 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H); 1.31 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 1.6-2.0 (m, 6 H), 2.23 (m, 1 H), 2.58 (s, 3H), 2.62 (s, 3 H), 2.73 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2 H), 2.75-2.9 (m, 2 H), 3.0-3.15 (m, 4 H), 3.28 (s, 3 H), 3.36 (s, 2 H), 4.10 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.8-7.1 (m, 7 H).

#### 工程2

工程 1 で得られた 1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]ピペリジン-4-カルボン酸エチルエステルを用い、参考例 1 2 と同様にして、収率 42% で化合物 1 2 1 を得た。  
APCI-MS: m/z 538 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.23 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 1.5-1.8 (m, 2 H), 1.8-2.0 (m, 2 H), 2.2-2.4 (m, 2 H), 2.49 (s, 3 H), 2.50 (s, 3 H), 2.78 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2 H), 2.8-3.05 (m, 8 H), 3.22 (s, 2 H), 3.5-3.9 (m, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.85 (dd,  $J = 2.0, 8.4$  Hz, 1 H), 6.93 (s, 1 H), 6.94 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1 H), 7.0-7.2 (m, 4 H).

参考例 5 3 : 化合物 1 2 2 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-8-[4-(2H-テトラゾール-5-イル)ピペリジノメチル]-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン・1塩酸塩} の合成

参考例 2 0 で得られた 1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]-ピペリジン-4-カルボニトリルを用い、参考例 5 2 の工程 1 と同様にして、収率 92% で 1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]ピペリジン-4-カルボニトリルを得た。これを用い、参考例 2 0 の後段と同様にして、収率 10% で 2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-8-[4-(2H-テトラゾール-5-イル)ピペリジノメチル]-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピンを得た。これをクロロホルムに溶解し、4 mol/L 塩化水素・酢酸エチル溶液を加えて析出した固体を濾取することで、化合物 1 2 2 を得た。

APCI-MS: m/z 562 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.28 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 2.0-2.5 (m, 4 H), 2.58 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.9-3.2 (m, 8 H), 3.2-3.3 (m, 4 H), 3.4-3.6

(m, 2 H), 4.17 (s, 2 H), 5.56 (s, 2 H), 7.0-7.2 (m, 4 H), 7.2-7.4 (m, 3H), 10.79 (s, 1H).

参考例 5 4 : 化合物 1 2 3 {[1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]ピペリジン-4-イルメタノール} の合成

参考例 5 2 の工程 1 で得られた 1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]ピペリジン-4-カルボン酸エチルエステル (0.61 g, 1.08 mmol) をジクロロメタン (10 mL) に溶解して、 $-78^{\circ}\text{C}$  に冷却し攪拌した。この反応溶液に同温度で 1 mol/L 水素化ジイソプロピルアルミニウム/トルエン溶液 (3.20 mL, 3.20 mmol) を加え、同温度で 3 時間、その後室温で 10 分間攪拌した。反応溶液に飽和ロッシェル塩水溶液と酢酸エチルを加え、30 分間攪拌した。水層を酢酸エチルで抽出後、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチルを用いて再結晶に付し、化合物 1 2 3 (0.26 g, 0.50 mmol, 収率 46%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  524 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.0-1.15 (m, 2H), 1.23 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 1.25-1.3 (m, 1 H), 1.5-1.65 (m, 2 H), 1.7-1.9 (m, 2 H), 2.49 (s, 3 H), 2.50 (s, 3 H), 2.75 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.95-3.05 (m, 4 H), 3.15-3.25 (m, 5 H), 3.25-3.50 (m, 4 H), 5.32 (s, 2 H), 6.81 (dd,  $J = 2.0, 8.5$  Hz, 1 H), 6.90-7.05 (m, 6 H).

参考例 5 5 : 化合物 1 2 4 [2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-8-(2H-テトラゾール-5-イル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン] の合成

参考例 3 4 で得られた化合物 1 0 3 を用い、参考例 5 2 の工程 1 と同様に、収率 83% で 8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピ

リジン-3-イルメチル)-5-メチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ  
[b,f]アゼピン-2-カルボニトリルを得た。

これを用い、参考例 20 の後段と同様にして、収率 20% で化合物 124 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  465 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.24 (t,  $J = 7.7$  Hz, 3 H), 2.50 (s, 3 H), 2.51 (s, 3 H), 2.80 (q,  $J = 7.7$  Hz, 2 H), 3.0-3.1 (m, 2 H), 3.3-3.35 (m, 2 H), 3.40 (s, 3 H), 5.38 (s, 2 H), 6.90 (dd,  $J = 2.2, 8.4$  Hz, 1 H), 6.95 (s, 1 H), 7.02 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1 H), 7.10 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1 H), 7.24 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2 H), 7.75 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1 H), 7.79 (dd,  $J = 2.2, 8.4$  Hz, 1 H) .

参考例 56 : 化合物 125 { [8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イル]酢酸 } の合成

参考例 36 で得られた化合物 105 を用い、参考例 52 の工程 1 と同様にして、収率 94% で [8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イル]アセトニトリルを得た。

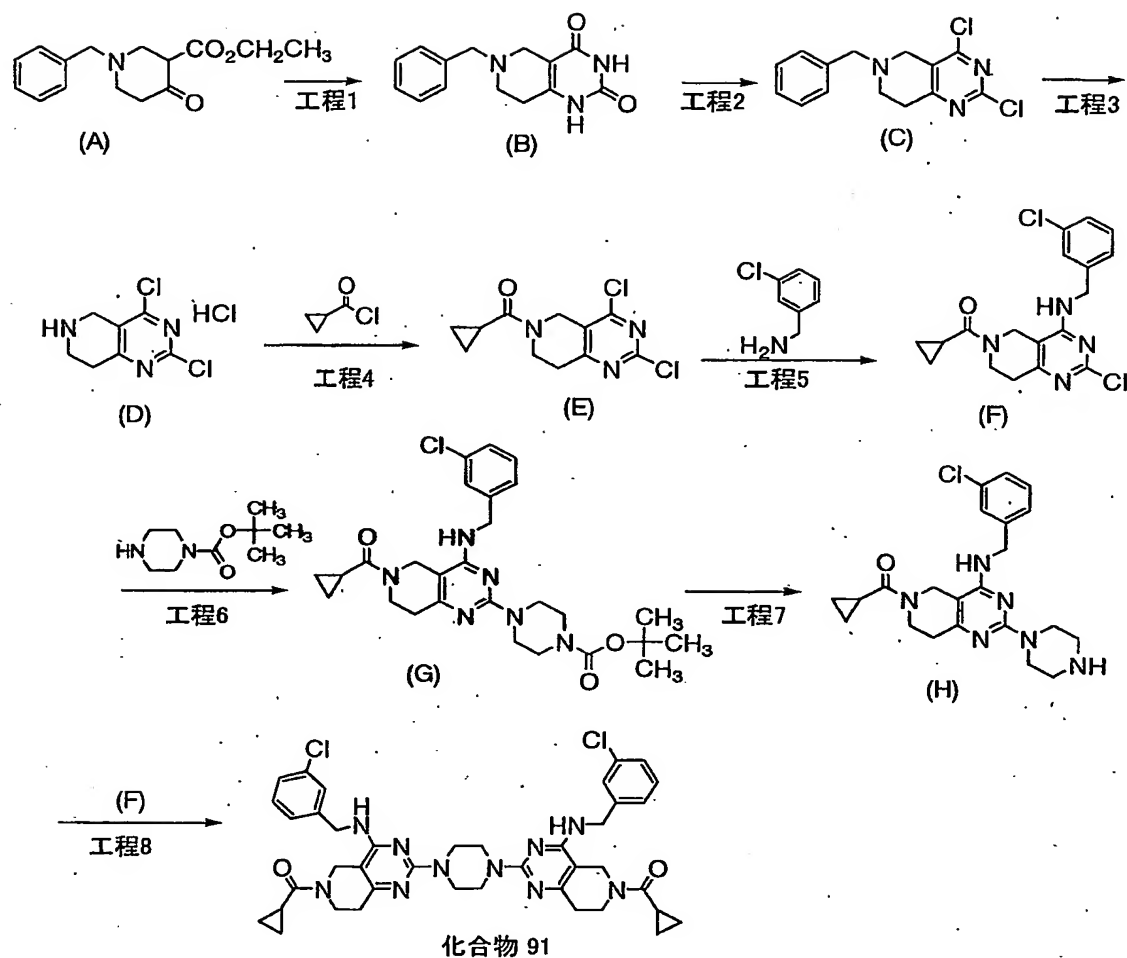
これを用い、参考例 38 と同様にして、収率 86% で化合物 125 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  455 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.22 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3 H), 2.49 (s, 3 H), 2.50 (s, 3 H), 2.75 (q,  $J = 7.3$  Hz, 2 H), 2.9-3.1 (m, 4 H), 3.19 (s, 3 H), 3.42 (s, 2 H), 5.32 (s, 2 H), 6.81 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H), 6.9-7.05 (m, 6 H) .

参考例 57 : 化合物 91 { 1,4-ビス[4-(3-クロロベンジルアミノ)-6-シクロプロピルカルボニル-7,8-ジヒドロ-5H-ピリド[4,3-d]ピリミジン-2-イル]ピペラジン } の合成

化合物 91 は、以下の工程 1 ~ 工程 8 に従って合成した。



## 工程 1

市販の化合物 (A) (100 g, 0.335 mol) をエタノール (1,500 mL) に溶解し、尿素 (100 g, 1.67 mol) およびナトリウムメトキシド (227 g, 1.18 mol) を加え、加熱還流条件下、24時間反応を行った。薄層クロマトグラフィーで反応の進行を確認し、冷却後、析出した結晶を濾取した。この結晶を水に懸濁させ、その中へ塩酸 (6 mol/L) を加え、pH6.0に調整した。さらに



1時間室温で攪拌し、析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥させ、化合物 (B) (60 g, 収率70%) を得た。

#### 工程 2

工程 1 で得られた化合物 (B) (30.0 g, 0.116 mol) にオキシ塩化リン (300 mL) を加え、加熱条件下で5時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーで反応の進行を確認後、減圧下で過剰のオキシ塩化リンを留去した。その後、残渣に2-プロパノール (300 mL) を加え、析出した結晶を含む懸濁液を加熱還流条件下、1時間攪拌し、さらに室温で1時間攪拌した。析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥させ、化合物 (C) (33 g, 収率85%) を得た。

#### 工程 3

工程 2 で得られた化合物 (C) (35.0 g, 0.106 mol) を1,2-ジクロロエタン (850 mL) に溶解し、そこへトリエチルアミン (14.9 mL, 0.107 mol) およびクロロ蟻酸 1-クロロエチル (34.1 mL, 0.316 mol) を加え、加熱還流条件下、5時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーで反応の進行を確認後、反応混合物を冷却し、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。得られた溶液を濃縮し、残渣をカラムクロマトグラフィー (シリカゲル、n-ヘキサン：酢酸エチル=3:1) で精製した。生成物をメタノール (850 mL) に溶解し、加熱還流条件下、1時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーで反応の進行を確認した後、濃縮乾固させることにより、化合物 (D) (23.5 g, 収率95%) を得た。

#### 工程 4

工程 3 で得られた化合物 (D) (11.8 g, 49.1 mmol) をジクロロメタン (300 mL) に溶解し、シクロプロパンカルボニルクロリド (5.4 mL, 1.2当量) とトリエチルアミン (20.4 mL, 3.0当量) を加え、室温で1時間攪拌した。得られた反応溶液を水、飽和重曹水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去した後、残渣にジイソプロピルエーテルを加え、懸濁液を1時間以上攪拌した。その後、析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥させることにより、化合物 (E) (12.5g, 収率 94%) を得た。

#### 工程 5

工程 4 で得られた化合物 (E) (12.5g, 45.9 mmol) をテトラヒドロフラ

ン (400 mL) に溶解し、トリエチルアミン (19.2 mL, 3当量) および3-クロロベンジルアミン (11.2 mL, 2当量) を加えた後、40℃で20時間攪拌した。析出した塩を濾過により除去後、溶媒を留去した。残渣をクロマトグラフィー (クロロホルム：メタノール=100：1 → 40：1) で精製し、目的物を含む画分の濃縮残渣にヘキサン／酢酸エチル混合溶媒 (3:1) を加え、結晶を析出させた。結晶を含む懸濁液を1時間攪拌後、析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥させ、化合物 (F) (11.9g, 収率 69%) を得た。

#### 工程 6

工程 5 で得られた化合物 (F) (5.0g, 13.3 mmol) をジオキサン (100 mL) に溶解し、tert-ブチル 1-ピペラジンカルボキシレート (4.9g, 2当量) と炭酸ナトリウム (14.0g, 10当量) を加え、90℃で3日間攪拌した。得られた反応溶液を濾過し、炭酸ナトリウムを除去後、濾液に水およびクロロホルムを加えて抽出を行い、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去した後、残渣にヘキサン／酢酸エチル混合溶媒 (3:1) を加え、懸濁液を1時間攪拌した。その後、析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥させ、化合物 (G) (6.4g, 収率 92%) を得た。

#### 工程 7

工程 6 で得られた化合物 (G) (6.3g, 12.0 mmol) に20%トリフルオロ酢酸のジクロロメタン溶液 (50 mL) を加え、室温で一時間攪拌した。反応溶液から溶媒を留去した後、残渣にジイソプロピルエーテルを加え、生成した懸濁液を1時間攪拌した。その後、析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥させ、化合物 (H) を得た (4.9 g, 収率 97%)。

#### 工程 8

工程 7 で得られた化合物 (H) (3.8 g, 8.90 mmol) と、工程 5 で得られた化合物 (F) (4.5g, 1.05当量) をジオキサン (100 mL) に溶解し、炭酸ナトリウム (10.6g, 10当量) を加え、90℃で1週間攪拌した。得られた反応溶液を濾過し、炭酸ナトリウムを除去後、濾液に水を加えクロロホルムで抽出した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した後、残渣をカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル：トリエチルアミン=10：1) で精製した。目的物を含む画分の濃縮残渣にヘキサン／酢酸エチル混合溶媒 (3:1) を

加え、生成した懸濁液を1時間攪拌した。その後、析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥させることにより、化合物 91 を得た (1.0g, 収率 23%)。

APCI-MS:  $m/z$  767 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.7-0.9 (m, 4 H), 1.0-1.1 (m, 4 H), 1.7-1.9 (m, 2 H), 2.6-2.8 (m, 4 H), 3.75 (s, 8 H), 3.8-4.0 (m, 4 H), 4.3-4.4 (m, 4 H), 4.6-4.7 (m, 4 H), 4.8-4.9 (m, 2 H), 7.1-7.3 (m, 8 H).

#### 参考例 58 : 宿主・ベクター系の構築

##### (1) Gal4-ER発現プラスミド pGERbsrR2 の造成

pSV2bsr (科研製薬社製) を PvuII と EcoRI で切断後、Klenow処理して 2.6kb の PvuII (平滑末端) - EcoRI (平滑末端) 断片を取得した。

Gal4-ERキメラ遺伝子 [セル (Cell)、54巻、199頁 (1988年)、プロシエーデングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステーツ・オブ・アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、90巻、1657頁 (1993年)] を含有する ER $\alpha$ AF2 in pM (東京大学の加藤茂明先生より分与) を AatII と NdeI で切断後、Klenow処理して、AatII (平滑末端) - NdeI (平滑末端) 断片を取得した。

上記の pSV2bsr 由来の PvuII (平滑末端) - EcoRI (平滑末端) 断片、および ER $\alpha$ AF2 in pM 由来の AatII (平滑末端) - NdeI (平滑末端) 断片を結合することにより、プラスミド pGERbsrR2 を造成した。pGERbsrR2 は、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の転写因子 Gal4p の DNA 結合領域とエストロゲン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質 (Gal4-ER) を発現することができる。

##### (2) ホタル・ルシフェラーゼの誘導発現プラスミドの造成

pcDNA3 (インビトロジェン社) を XhoI で切断後、Klenow処理して、XhoI (平滑末端) 断片を取得した。該断片を結合することにより、XhoI 切断部位を消失させた pcDNA3 を造成した。XhoI 切断部位を消失させた pcDNA3 を KpnI で切断後、Klenow処理して、KpnI (平滑末端) 断片を取得した。該断片を結合することにより、XhoI および KpnI 切断部位を消失させた pcDNA3 を造成した。該プラスミドを BglIII で切断後、Klenow処理し、BglIII (平滑末端) 断片を取得し

た。

pAMoERC3Sc (特開平05-336963) を XhoI と NsiI で切断後、Klenow処理し、oriP配列を含む2.2kbの XhoI (平滑末端) - NsiI (平滑末端) 断片を取得した。

上記の XhoI 切断部位と KpnI 切断部位を消失させたpcDNA3由来の BglII (平滑末端) 断片、およびpAMoERC3Sc由来の XhoI (平滑末端) - NsiI (平滑末端) 断片を結合することにより、プラスミドpcDNA3-oriPを造成した。pcDNA3-oriPを XhoI と HindIII で切断し、XhoI - HindIII 断片を取得した。

pSE0luc2 (WO98/14474) を XhoI と NcoI で切断後、Klenow処理して、アンピシリン耐性遺伝子を含む XhoI (平滑末端) - NcoI (平滑末端) 断片を取得した。該断片を結合することにより、プラスミドpASd1-luc1を造成した。pASd1-luc1を XhoI と HindIII で切断後、0.11kbの XhoI - HindIII 断片を取得した。

上記pcDNA3-oriP由来の XhoI - HindIII 断片、およびpASd1-luc1由来の XhoI - HindIII 断片を結合し、プラスミドpcDNA3-oriP-Sd1を造成した。pcDNA3-oriP-Sd1を XhoI と KpnI で切断し、XhoI - KpnI 断片を取得した。

配列番号1、2、3、および4で表される塩基配列を有する4種のDNAをDNA合成機で合成した。該合成DNAは混合してアニールすることによりポリA付加シグナルをもつ2本鎖DNAを形成する。該合成DNAをそれぞれT4 polynucleotide kinaseを用いてリン酸化後、混合してアニールさせることにより、二本鎖DNAとした。

該二本鎖DNAとpcDNA3-oriP-Sd1由来の XhoI - KpnI 断片を結合することにより、プラスミドpcDNA3-oriP-Sd1-pAを造成した。pcDNA3-oriP-Sd1-pAを XhoI で切断後、Klenow処理して、XhoI (平滑末端) 断片を取得した。

pFR-luc(ストラタジーン社製)を HindIII と BamHI で切断後、Klenow処理し、0.14kbの HindIII (平滑末端) - BamHI (平滑末端) 断片を取得した。

上記のpcDNA3-oriP-Sd1-pA由来の XhoI (平滑末端) 断片、およびpFR-luc由来の HindIII - BamHI 断片を結合し、プラスミドpAGalSd1を作製した。pAGalSd1は、Gal4p応答配列 (UASG) を5回繰り返した配列を有するプロモーターを含有している。pAGalSd1を EcoRI で切断後、Klenow処理し、EcoRI

(平滑末端)断片を取得した。

pSE0luc2 (WO98/14474) をHindIIIとSacIで切断後、Klenow処理することにより、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含む1.7kbのHindIII (平滑末端) - SacI (平滑末端)断片を取得した。

上記のpSE0luc2由来のHindIII (平滑末端) - SacI (平滑末端)断片、およびpAGalSd1由来のEcoRI (平滑末端)断片を結合することにより、プラスミドpAGalSd1-lucを造成した。

pAGalSd1-luc内に存在する二つのHindIIIサイトのうち、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子からより離れたHindIIIサイトのみをKlenow処理により消失させることにより、pAGalSd4-lucを造成した。

pAGalSd4-lucをAsp718で切断後、StuIで部分消化しpAGalSd4-luc由来の9.5kbのAsp718-StuI断片を取得した。該DNA断片をKlenow処理し、自己結合させることによりプラスミドpAGal9-lucを造成した。

### (3) 誘導発現ベクターpAGal9-dおよびpAGal9-ndの造成

エプスタイン・バー・ウイルスのoriPを有する発現プラスミドpAGal9-lucをHindIIIとSacIで切断し、oriPを含む6.9kbのHindIII-SacI断片を取得した。

pAMo-d (特開2001-211885) をHindIIIとSacIで切断し、テトラサイクリン耐性遺伝子 (Tc<sup>R</sup>) を含むHindIII-SacI断片を取得した。

上記のpAGal9-luc由来のHindIII-SacI断片、およびpAMo-d由来のHindIII-SacI断片を結合することにより、pAGal9-luc中のホタル・ルシフェラーゼ遺伝子部分をpAMo-dのStuffer配列と置き換えたプラスミドpAGal9-dを造成した。pAGal9-lucをHindIIIとSacIで切断し、6.9kbのHindIII-SacI断片を取得した。

pAMo-nd (特開2001-211885) をHindIIIとSacIで切断し、テトラサイクリン耐性遺伝子を含むHindIII-SacI断片を取得した。

上記のpAGal9-luc由来のHindIII-SacI断片、およびpAMo-nd由来のHindIII-SacI断片を結合することにより、pAGal9-luc中のホタル・ルシフェラーゼ遺伝子部分をpAMo-ndのStuffer配列と置き換えたプラスミドpAGal9-ndを造成した。

(4) Gal4-ER発現プラスミドpGERbsrR2をNamalwa KJM-1細胞の染色体DNAに組み込んだ細胞株KJMGER8の造成

Gal4-ERキメラ転写因子発現プラスミドpGERbsrR2を、 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるようにTE緩衝液〔10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)、1 mmol/L エチレンジアミン4酢酸〕に溶解した後、エレクトロポレーション法〔サイトテクノロジー (Cytotechnology)、3巻、133頁(1990年)〕により、該プラスミドをNamalwa KJM-1細胞〔サイトテクノロジー (Cytotechnology)、1巻、151頁(1988年)〕に、 $6\times 10^6$ 細胞あたり $4\mu\text{g}$ 導入し、形質転換細胞を得た。Namalwa KJM-1細胞は、EBNA-1遺伝子を発現する無血清馴化したB細胞株である。

該形質転換細胞を、8mlのRPMI1640・ITPSG培地〔RPMI1640培地(日水製薬社製)に、1/40量の7.5%  $\text{NaHCO}_3$ 、3% 200mmol/L L-グルタミン溶液(インビトロジェン社製)、0.5% ペニシリン・ストレプトマイシン溶液(インビトロジェン社製、5,000units/ml ペニシリン、5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$  ストレプトマイシン)、10mmol/L N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; HEPES)、3 $\mu\text{g}/\text{ml}$  インシュリン、5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  トランスフェリン、5 mmol/L ビルビン酸ナトリウム、125 nmol/L 亜セレン酸ナトリウム、1 mg/ml ガラクトースを添加した培地〕に懸濁し、 $\text{CO}_2$ インキュベーター中で $37^\circ\text{C}$ で24時間培養した。

培養後、プラストサイジンS (Blasticidin S) (KK-400: 科研製薬社製)を $2.0\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、96穴プレートに分注(500~2000細胞/穴)して培養を行い、pGERbsrR2が染色体DNAに組み込まれた安定形質転換株(シングルクローン)を多数取得した。各形質転換株は、 $2.0\mu\text{g}/\text{ml}$ のプラストサイジンSを含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

下記に示す方法により上記安定形質転換株から、誘導倍率が高く、かつ非誘導時のバックグラウンドが低い優れた安定形質転換株KJMGER8細胞を選択した。

各形質転換株にホタル・ルシフェラーゼの誘導発現プラスミドpAGalSd1-lucをエレクトロポレーション法により導入し、2日間培養した。

培養後、 $17\beta$ -エストラジオール(E8875: シグマ社製)(終濃度10nmol/L)を添加し、さらに24時間培養後、ホタル・ルシフェラーゼ活性の測定を行っ

た。活性の測定には、ルミノメーターLB953（ベルトールド社製）を用い、細胞溶解用緩衝液〔1%トリトンX-100、100 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH7.8)、1 mmol/L ジチオスレイトール〕100  $\mu\text{l}$ を、上記培養液に自動注入後、基質溶液〔25 mmol/L グリシルグリシン (pH7.8)、15 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ 、5 mmol/L ATP、0.33 mmol/L ルシフェリン〕300  $\mu\text{l}$ を自動注入し、10秒間の発光量を測定し、ルシフェラーゼ活性とした。比較のために、 $17\beta$ -エストラジオール無添加条件下でのルシフェラーゼ活性も測定した。

$17\beta$ -エストラジオール添加条件下でのルシフェラーゼ活性と $17\beta$ -エストラジオール無添加条件下でのルシフェラーゼ活性を比較することにより、遺伝子発現の誘導倍率を算出し、該誘導倍率が高く、かつ $17\beta$ -エストラジオール無添加条件下のルシフェラーゼ活性が低いクローンとして、KJMGR8細胞を選択した。

参考例 59：ホタル・ルシフェラーゼをレポーターとするレポータープラスミド pACREpluc の造成

cAMP応答配列 (CRE) の制御下にホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を発現することのできるレポータープラスミドである pACREpluc を以下の方法で造成した。pACREpluc は、ハイグロマイシン耐性遺伝子およびエプスタイン・バー・ウィルスの oriP を有している。

pAMo [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)、268 巻、22782 頁 (1993 年)、別名 pAMoPRC3Sc (特開平 5-336963)] を ClaI で部分消化し、一カ所切断された DNA 断片を取得した。該 DNA 断片を MluI で部分消化し、9.5 kb の ClaI-MluI 断片を取得した。pAGE248 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)、269 巻、14730 頁 (1994 年)] を ClaI および MluI で切断し、ハイグロマイシン耐性遺伝子を含む 1.5 kb の ClaI-MluI 断片を取得した。pAMo 由来の ClaI-MluI 断片、および pAGE248 由来の ClaI-MluI 断片を結合し、プラスミド pAMoh を造成した。

pAMoh を XhoI と HindIII で切断後、ハイグロマイシン耐性遺伝子を含む XhoI-HindIII 断片を取得した。pGal9-luc を SalI と HindIII で切断し、oriP、Gal4UAS を含む SalI-HindIII 断片を取得した。pGal9-luc 由来の SalI-HindIII 断片、および上記 pAMoh 由来の XhoI-HindIII 断片を結合することに

より、プラスミドpAGal9hを造成した。

pBluescriptII KS+ (東洋紡績社製) をSalIおよびXhoIで切断した後、ホスファターゼ (Alkaline Phosphatase E.coli C75、宝酒造社製) を用いて脱リン酸化処理し、アンピシリン耐性遺伝子を含むSalI-XhoI断片を取得した。配列番号5および6で表される塩基配列を有する合成オリゴヌクレオチドをアニールさせることにより、CRE配列を2つ含む二本鎖DNAを調製した。該二本鎖DNAとpBluescriptII KS+由来の上記SalI-XhoI断片を結合し、CRE配列を2つ含むプラスミドpBS-CREIを造成した。pBS-CREIは、該二本鎖DNAが、SalI切断部位およびXhoI切断部位が再生する方向に組み込まれたプラスミドであり、上記切断部位をそれぞれ1つ有している。

pBS-CREIをScaIおよびXhoIで切断しファージf1のoriを含むScaI-XhoI断片を取得した。pBS-CREIをScaIおよびSalIで切断しColE1 oriを含むScaI-SalI断片を取得した。pBS-CREI由来のScaI-XhoI断片およびScaI-SalI断片を結合し、CRE配列を4つ含むpBS-CREIIを造成した。

pBS-CREIIをScaIおよびXhoIで切断しファージf1のoriを含むScaI-XhoI断片を取得した。pBS-CREIIをScaIおよびSalIで切断しColE1 oriを含むScaI-SalI断片を取得した。pBS-CREII由来のScaI-XhoI断片およびScaI-SalI断片を結合しCRE配列を8つ含むpBS-CREIVを造成した。

pBS-CREIVをScaIおよびXhoIで切断しファージf1のoriを含むScaI-XhoI断片を取得した。pBS-CREIVをScaIおよびSalIで切断しColE1 oriを含むScaI-SalI断片を取得した。pBS-CREIV由来のScaI-XhoI断片およびScaI-SalI断片を結合しCRE配列を16含むpBS-CREVIIIを造成した。

pBS-CREVIIIをXhoIで切断後、Klenow処理し、さらにHindIIIで切断することにより、16個のCREを含むHindIII-XhoI (平滑末端) 断片を取得した。pAGalSd1をMluIとHindIIIで切断し、1.4kbのMluI-HindIII断片を取得した。pAGal9hをXbaIで切断後、Klenow処理し、さらにMluIで切断することによりXbaI (平滑末端) -MluI断片を取得した。pBS-CREVIII由来のHindIII-XhoI (平滑末端) 断片、pAGalSd1由来のMluI-HindIII断片、およびpAGal9h由来のXbaI (平滑末端) -MluI断片を結合し、プラスミドpACREhを造成した。

pAGal9-lucをXhoIとNotIで切断し、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含



含むXhoI-NotI断片を取得した。pACREhをXhoIとNotIで切断し、CRE配列を含むXhoI-NotI断片を取得した。pAGal9-luc由来のXhoI-NotI断片、およびpACREh由来のXhoI-NotI断片を結合することによりプラスミドpACRElucを造成した。

pACRElucをHindIIIで切断後、Klenow処理し、さらにXhoIで切断することによりCREを含むHindIII（平滑末端）-XhoI断片、およびホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含むHindIII（平滑末端）-XhoI断片をそれぞれ取得した。pACREluc由来の上記2種のHindIII（平滑末端）-XhoI断片を結合することにより、pACREluc中のCRE配列上流のHindIIIサイトが消失したプラスミドpACRElucHを造成した。

pGL3-Enhancer vector〔プロメガ(Promega)社製〕をHindIIIとHpaIで切断し、luc+遺伝子（改変型のホタル・ルシフェラーゼ遺伝子）を含むHindIII-HpaI断片を取得した。pACRElucHをNotIで切断後、Klenow処理し、さらにHindIIIで切断することにより、CREを含むHindIII-NotI（平滑末端）断片を取得した。pGL3-Enhancer vector由来のHindIII-HpaI断片、およびpACRElucH由来のHindIII-NotI（平滑末端）断片を結合することによりプラスミドpACREplucを造成した。

#### 参考例60：GPR4誘導発現プラスミドの造成

ヒト肺由来のmRNA（クロンテック社製）を1 $\mu$ g用い、SUPERScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR（ギブコ社製）により一本鎖cDNAを合成した。該一本鎖cDNAを水で250倍希釈した溶液5 $\mu$ lを鋳型として、配列番号7および8に示した配列を有する合成DNAをGPR4遺伝子特異的プライマーとして用い、PCRによりGPR4 cDNAを取得した。GPR4遺伝子特異的プライマーの配列は、GPR4遺伝子の配列情報（GenBank受入番号：U21051）に基づいて設計した。酵素としては、PfuTurbo DNA Polymerase（Stratagene社製）を用いた。PCRを行う際の緩衝液としては、使用する酵素に付加された10倍濃度の緩衝液を使用した。PCRは、サーマルサイクラーDNA engine（MJ Research社製）を用い、95°Cで5分間の処理後、94°Cで1分間、60°Cで1分間、72°Cで1分間からなる反応を30サイクル行うことにより実施した。

増幅されたGPR4 cDNA断片をプライマー上に設計された配列を切断するHindIIIおよびNot Iで切断した。GPR4 cDNAを含む断片をアガロースゲル電気泳動法により回収した。

該切断断片を、プラスミドpAGal9-ndのHindIII-Not I間へ組み込むことにより、GPR4誘導発現プラスミドpAGal9-GPR4を構築した。

pAGal9-nd中の配列に特異的なプライマー（配列番号9および10に示した配列を有する合成DNA）を用いて、該cDNAの5'側および3'側の配列を決定した。決定された配列に特異的な合成DNAを調製し、それをプライマーとして用い、さらに先の塩基配列を決定した。該操作を繰り返すことにより、該cDNAの全塩基配列を決定しGPR4をコードしていることを確認した。塩基配列の決定には、パーキン・エルマー社のDNAシーケンサー377と反応キット（ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit:アプライド・バイオシステムズ社）を使用した。

プラスミドに組み込んだDNA断片の配列を決定し、GPR4をコードしていることを確認した。

#### 参考例 61 : GPR4のアッセイ細胞の構築

GPR4誘導発現プラスミドpAGal9-GPR4 (2 μg) およびレポータープラスミドpACREpluc (2 μg) を、上記エレクトロポレーション法により、 $6 \times 10^6$  細胞のKJMGER8に共導入した。該形質転換株を8mlのRPMI1640・ITPSG培地に懸濁し、CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37°Cで24時間培養した。培養後、プラストサイジンS (2.0 μg/ml)、ハイグロマイシンB (300 μg/ml) およびジェネティシン (500 μg/ml) を添加し、さらに14日間培養して安定形質転換株（GPR4アッセイ細胞と呼ぶ）を取得した。該形質転換株を、プラストサイジンS (2.0 μg/ml)、ハイグロマイシンB (300 μg/ml) およびジェネティシン (500 μg/ml) を含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

同様に、コントロールプラスミドpAGal9-nd (2 μg) およびレポータープラスミドpACREpluc (2 μg) をKJMGER8に共導入し、安定形質転換株（コントロール細胞と呼ぶ）を取得した。

参考例 6 2 : マウス由来のヒト GPR4 ホモログをコードする DNA のクローニング

ヒト GPR4 遺伝子の塩基配列情報 [Accession (AC) No. U21051] を基に、NCBI のデータベースを対象として検索を行った。その結果、相同性の高い配列として、マウスゲノム配列 (AC073784) および複数の Expression sequence tag (EST) 配列 (BF178464、AA968193、AA798732、AI840893、AI851037) が選択された。該マウスゲノム配列と EST から構築された遺伝子の塩基配列を配列番号 14 に、該遺伝子によりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号 13 に示した。該アミノ酸配列を、解析プログラム [GENETYX WIN ver. 5.0 (ソフトウェア社製)] を用いてヒト GPR4 のアミノ酸配列と比較したところ、92.7% の一致が認められた。

よって、配列番号 13 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、マウスのヒト GPR4 ホモログ (マウス GPR4) であることが推定された。

従って、マウス GPR4 をコードする DNA は、市販、または公知の方法で調製することができるマウス cDNA ライブラリーを鋳型にし、配列番号 14 で表される塩基配列に基づき設計、合成できるオリゴヌクレオチドをプライマーセットに用いた PCR により取得することができる。

参考例 6 3 : ラット由来のヒト GPR4 ホモログをコードする DNA のクローニング

ヒト GPR4 遺伝子の塩基配列情報 (AC No. U21051) を基に、NCBI のデータベースを対象として検索を行った。その結果、相同性の高い配列として 2 つのラットゲノム配列 (AC119447.2 および AC096180.2) および複数のラット EST 配列 (BF544182、AI170948、AI008858、AI235374、AI502871、BQ194515) が選択された。これらの配列と、配列番号 14 で示したマウスの塩基配列情報を基に配列番号 15 および配列番号 16 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを作製した。

該オリゴヌクレオチド各々  $1.0 \mu\text{mol/L}$  をプライマーセットとして用い、ラット肺由来 mRNA から作製した cDNA  $2 \mu\text{L}$  を鋳型に用い、後記の各成分の濃度が  $200 \mu\text{mol/L}$  となるよう dNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、Taq Gold (パー

キンエルマー社製) 2.5単位および1 × Taq Gold (Mg plus) 緩衝液(パーキンエルマー社)を含む反応溶液40 $\mu$ Lを調製し、下記条件下でPCRを行った。

すなわち、サーマルサイクラーPTC-200 (MJリサーチ社製) を用い、95°Cで10分間加熱後、94°Cで1分間、55°Cで1分間、72°Cで1分間の工程を1サイクルとして30サイクル行い、さらに72°Cで5分間加熱した。

得られたPCR反応液より5 $\mu$ Lを分取し、アガロースゲル電気泳動によりGPR4をコードするDNAと予想される約1.1kbのDNA断片が増幅されたことを確認後、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、該製品に添付されたマニュアルに従い、DNA断片を溶出し回収した。

上記で回収したDNA断片50ngとpT7Blue T-Vector (Novagen社製) 50ngとをDNA Ligation kit ver.2 (宝酒造社製) を用いて該製品に添付されたマニュアルに従って連結し、組換えプラスミドDNAを得た。得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換して得られる形質転換株から、常法によりプラスミドpT7RGを得た。プラスミドpT7RGの全塩基配列を決定した結果、pT7RGには配列番号18で表される塩基配列を有する約1.1kbのcDNAが含まれていた。配列番号18で表される塩基配列からなるDNAにコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号17に示した。該アミノ酸配列を、解析プログラム [GENETYX WIN ver. 5.0 (ソフトウェア社製)] を用いてヒト、およびマウスGPR4のアミノ酸配列と比較したところ、それぞれ93.0%、99.2%の一致が認められた。

よって、配列番号17で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、ラットのヒトGPR4ホモログ (ラットGPR4) であることが推定された。

#### 実施例 1

常法により、次の組成からなる錠剤を調製する。

|    |                |          |
|----|----------------|----------|
| 処方 | 化合物 1          | 20 mg    |
|    | 乳糖             | 143.4 mg |
|    | 馬鈴薯デンプン        | 30 mg    |
|    | ヒドロキシプロピルセルロース | 6 mg     |

|              |        |
|--------------|--------|
| ステアリン酸マグネシウム | 0.6 mg |
|              | 200 mg |

## 実施例 2

常法により、次の組成からなる注射剤を調製する。

|    |          |         |
|----|----------|---------|
| 処方 | 化合物 5    | 2 mg    |
|    | 精製ダイズ油   | 200 mg  |
|    | 精製卵黄レシチン | 24 mg   |
|    | 注射用グリセリン | 50 mg   |
|    | 注射用蒸留水   | 1.72 ml |
|    |          | 2.00 ml |

## 産業上の利用可能性

本発明により、GPR4のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質を有効成分として含有する好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤、含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤、上記の式 (II) で表される化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤等が提供される。

## 配列表フリーテキスト

配列番号 1 - 人工配列の説明：合成DNA  
 配列番号 2 - 人工配列の説明：合成DNA  
 配列番号 3 - 人工配列の説明：合成DNA  
 配列番号 4 - 人工配列の説明：合成DNA  
 配列番号 5 - 人工配列の説明：合成DNA  
 配列番号 6 - 人工配列の説明：合成DNA  
 配列番号 7 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 8－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 9－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 10－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 15－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 16－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 19－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 20－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 21－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 22－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 23－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 24－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 25－人工配列の説明：合成DNA

### 請求の範囲

1. 配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質を有効成分として含有する好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤。

2. 好中球性炎症疾患が、慢性閉塞性肺疾患(COPD)である請求の範囲第1項記載の好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤。

3. 以下の1)～4)

1) 配列番号12記載の塩基配列から選ばれる連続した15～60塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、

2) 配列番号14記載の塩基配列から選ばれる連続した15～60塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、

3) 配列番号18記載の塩基配列から選ばれる連続した15～60塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、

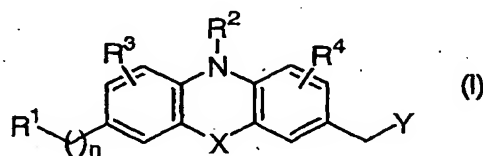
4) 配列番号12、14および18から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する15～60塩基からなるオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、

のいずれか一つを有効成分として含有する好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤。

## 4. 以下の1)～4)

- 1) 配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体、
  - 2) 配列番号13記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体、
  - 3) 配列番号17記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体、
  - 4) 配列番号11、13および17から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列を有し、かつ配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を有する蛋白質を認識する抗体、
- のいずれか一つを有効成分として含有する好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤。

## 5. 式(I)



[式中、 $R^1$ は置換もしくは非置換の複素環基、 $-NR^5R^6$  (式中、 $R^5$ および $R^6$ は同一または異なって水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表すか、 $R^5$ および $R^6$ が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する)、 $-OR^7$  (式中、 $R^7$ は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表す)、 $-SR^{7a}$  (式中、 $R^{7a}$ は前記 $R^7$ と同義である)、 $-CONR^{5a}R^{6a}$  (式中、 $R^{5a}$ および $R^{6a}$ はそれぞれ前記 $R^5$ および前記 $R^6$ と同義である)、



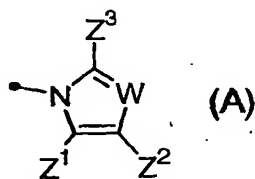
$-\text{CO}_2\text{R}^{7b}$  (式中、 $\text{R}^{7b}$ は前記 $\text{R}^7$ と同義である)、ホルミル、またはシアノを表し、 $\text{R}^2$ は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表し、

$\text{R}^3$ および $\text{R}^4$ は同一または異なって水素、低級アルキル、またはハロゲンを表し、

$n$ は0または1を表し、

$\text{X}$ は $-(\text{CH}_2)_2-$ または $-\text{CH}=\text{CH}-$ を表し、

$\text{Y}$ は式 (A)



(式中、 $\text{W}$ は $\text{CH}$ または窒素原子を表し、

$\text{Z}^1$ および $\text{Z}^2$ は同一または異なって水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表すか、 $\text{Z}^1$ および $\text{Z}^2$ がそれぞれが隣接する2つの炭素原子と一緒になって置換もしくは非置換の芳香環を形成するか、または $\text{Z}^1$ および $\text{Z}^2$ がそれぞれが隣接する2つの炭素原子と一緒になって置換もしくは非置換の複素環を形成し、

$\text{Z}^3$ は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換の複素環基、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表す)を表す]で表される含窒素三環式化合物もしくはその

四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤。

6.  $R^1$ が $-NR^5R^6$ であり、 $R^5$ および $R^6$ が隣接する窒素原子と一緒になって置換もしくは非置換の複素環基を形成する請求の範囲第5項記載の好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤。

7.  $R^2$ が水素である請求の範囲第5項または第6項に記載の好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤。

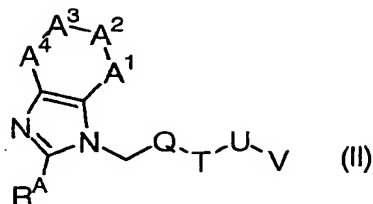
8.  $R^3$ および $R^4$ が水素である請求の範囲第5項～第7項のいずれかに記載の好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤。

9.  $Z^1$ および $Z^2$ がそれぞれが隣接する2つの炭素原子と一緒になって置換もしくは非置換の複素環を形成する請求の範囲第5項～第8項のいずれかに記載の好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤。

10. 請求の範囲第5項～第9項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩の有効量を投与することを特徴とする、好中球性炎症疾患の予防および／または治療方法。

11. 好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤の製造のための請求の範囲第5項～第9項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩の使用。

12. 式 (II)

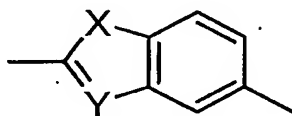


{式中、 $R^A$ は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアロイル、置換もしくは非置換の複素環基、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表し、

$A^1-A^2-A^3-A^4$ は $N=CR^C-CR^D=CR^E$ （式中、 $R^C$ 、 $R^D$ および $R^E$ は同一または異なって、それぞれ前記 $R^A$ と同義である）、 $CR^B=CR^C-CR^D=CR^E$ （式中、 $R^B$ 、 $R^C$ 、 $R^D$ および $R^E$ は同一または異なって、それぞれ前記 $R^A$ と同義である）、 $N=CR^C-N=CR^E$ （式中、 $R^C$ および $R^E$ は同一または異なって、それぞれ前記 $R^A$ と同義である）または $CR^B=CR^C-N=CR^E$ （式中、 $R^B$ 、 $R^C$ および $R^E$ は同一または異なって、それぞれ前記 $R^A$ と同義である）を表し、

Qは、置換もしくは非置換のフェニレン（但し、置換フェニレンにおける置換基はシアノ、ニトロ、 $CONH_2$ 、 $-NHSO_2R^Q$ （式中、 $R^Q$ は前記 $R^A$ と同義である）および低級アルコキシカルボニルではない）、置換もしくは非置換のナフチレン（但し、置換ナフチレンにおける置換基はシアノ、ニトロ、 $CONH_2$ 、 $-NHSO_2R^Q$ （式中、 $R^Q$ は前記 $R^A$ と同義である）および低級アルコキシカルボニルではない）、炭素数2～6で窒素、酸素および硫黄から任意に選ばれる原子数1～4である置換もしくは非置換の不飽和もしくは部分的に不飽和の5～7員の単環式複素環から2つの水素原子が除かれた基（但し、炭素数2～6で窒素、酸素および硫黄から任意に選ばれる原子数1～4である置換の不飽和もしくは部分的に不飽和の5～7員の単環式複素環における置換基はシアノ、ニトロ、 $CONH_2$ 、 $-NHSO_2R^Q$ （式中、 $R^Q$ は前記 $R^A$ と同義である）および低級アルコキシカルボニルではない）、炭素数4～10で窒素、酸素および硫黄から任意に選ばれる原子数1～4である置換もしくは非置換の不飽和もしくは部分的に不飽

和の環構成原子数が8～11の二環式複素環から2つの水素原子が除かれた基  
 但し、炭素数4～10で窒素、酸素および硫黄から任意に選ばれる原子数1  
 ～4である不飽和もしくは部分的に不飽和の環構成原子数が8～11の二環式  
 複素環から2つの水素原子が除かれた基が、



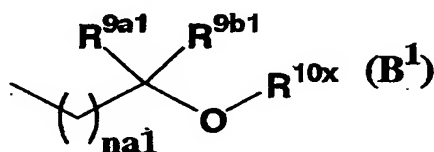
{式中、

XはNR<sup>X</sup> [式中、R<sup>X</sup>は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換のシクロアルキルカルボニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアロイルまたは置換もしくは非置換の芳香族複素環基（テトラゾリルを除く）を表す]、酸素原子または硫黄原子を表し、

Yは窒素原子またはCR<sup>XI</sup> [式中、R<sup>XI</sup>は水素、低級アルキル、以下の置換基群Aから選ばれる同一のまたは異なる1～3の置換基で置換された低級アルキル、[置換基群A：ハロゲン、ヒドロキシ、ホルミル、トリフルオロメチル、ビニル、スチリル、フェニルエチニル、アロイル、置換もしくは非置換の脂環式複素環基および置換もしくは非置換の芳香族複素環基（テトラゾリルを除く）]、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換のシクロアルキルカルボニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアロイル、置換もしくは非置換の芳香族複素環基（テトラゾリルを除く）、式（A<sup>1</sup>）

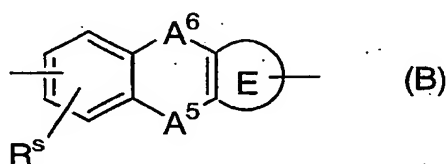


{式中、Q---Vは $CR^{7x}=CR^{8x}$  [式中、 $R^{7x}$ および $R^{8x}$ は同一または異なって、水素、低級アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換のシクロアルキルカルボニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアロイルまたは置換もしくは非置換の芳香族複素環基（テトラゾリルを除く）を表す] または $C\equiv C$ を表し、 $R^8$ は水素、低級アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換のシクロアルキルカルボニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアロイルまたは置換もしくは非置換の芳香族複素環基（テトラゾリルを除く）を表す} または式 ( $B^1$ )



[式中、 $na1$ は0~3の整数を表し、 $R^{9a1}$ および $R^{9b1}$ は、同一または異なって水素、ハロゲン、低級アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換のシクロアルキルカルボニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアロイルまたは置換もしくは非置換の芳香族複素環基（テトラゾリルを除く）を表すか、または $R^{9a1}$ と $R^{9b1}$ が隣接する炭素原子と一緒になって飽和脂肪族環を形成し、 $R^{10x}$ は置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換のシクロアルキルカルボニル、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアロイルまたは置換もしくは非置換の芳香族複素環基（テトラゾリルを除く）を表す] を表す} を表す

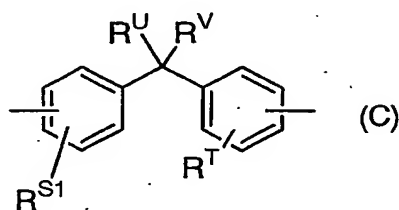
すときは、炭素数4～10で窒素、酸素および硫黄から任意に選ばれる原子数1～4である置換の不飽和もしくは部分的に不飽和の環構成原子数が8～11の二環式複素環から2つの水素原子が除かれた基における置換基はニトロ、シアノおよび低級アルコキシカルボニルではない>、  
式 (B)



〔式中、 $A^5$ は $-CR^P R^Q-$ （式中、 $R^P$ および $R^Q$ は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換の複素環基、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル、またはモノもしくはジ低級アルキルアミノカルボニルを表す）、 $-CR^P R^Q-CR^H R^J-$ （式中、 $R^P$ および $R^Q$ はそれぞれ前記と同義であり、 $R^H$ および $R^J$ はそれぞれ前記 $R^P$ および $R^Q$ と同義である）、 $-N=CR^H-$ （式中、 $R^H$ は前記と同義である）、 $-CR^P=N-$ （式中、 $R^P$ は前記と同義である）、 $-CR^P=CR^H-$ （式中、 $R^P$ および $R^H$ はそれぞれ前記と同義である）、 $-OCR^H R^J-$ （式中、 $R^H$ および $R^J$ はそれぞれ前記と同義である）、 $-CR^P R^Q O-$ （式中、 $R^P$ および $R^Q$ はそれぞれ前記と同義である）、 $-SO_{n1} CR^H R^J-$ （式中、 $R^H$ および $R^J$ はそれぞれ前記と同義であり、 $n1$ は0～2の整数を表す）、 $-CR^P R^Q SO_{n1}-$ （式中、 $R^P$ 、 $R^Q$ および $n1$ はそれぞれ前記と同義である）、 $-O-$ 、または $-SO_{n1}-$ （式中、 $n1$ は前記と同義である）を表し、  
 $A^6$ は $-CR^{Pa} R^{Qa}-$ （式中、 $R^{Pa}$ および $R^{Qa}$ はそれぞれ前記 $R^P$ および $R^Q$ と同義である）、 $-C(=O)-$ または $-NR^R-$ （式中、 $R^R$ は前記 $R^A$ と同義である）を表し、  
 $R^S$ は、水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアロイル、置換もしくは非置換の複素環基、置換もしくは非置換の複素環アルキル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒ

ドロキシ、カルボキシ、アミノ、低級アルコキシ、またはモノもしくはジ低級アルキルアミノを表し、

環Eはベンゼン環、または窒素、酸素および硫黄から任意に選ばれる元素を1個以上有する芳香族複素環を表す]、または式 (C)



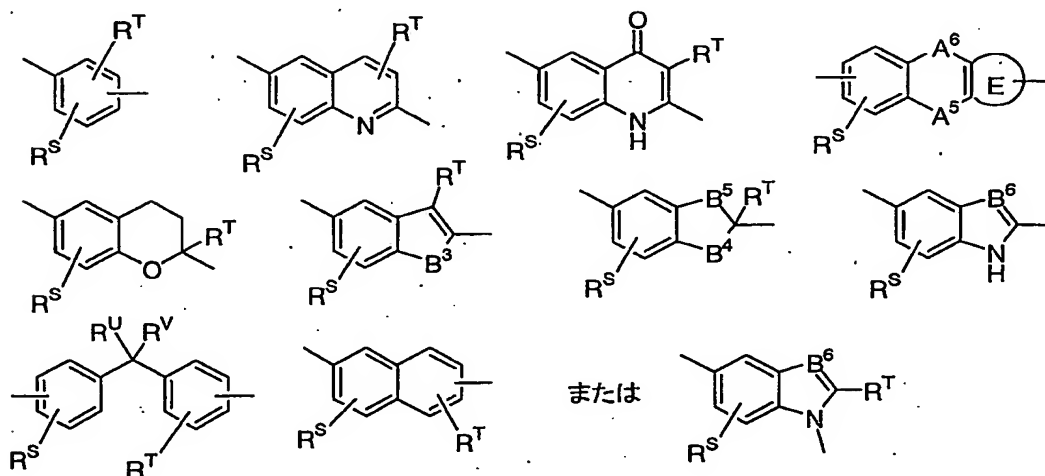
(式中、 $R^{S1}$ 、 $R^T$ 、 $R^U$ および $R^V$ は同一または異なって、水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアロイル、置換もしくは非置換の複素環基、置換もしくは非置換の複素環アルキル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、低級アルコキシ、またはモノもしくはジ低級アルキルアミノを表し、 $R^U$ および $R^V$ は同一または異なって、さらに低級アルコキシカルボニル、またはモノもしくはジ低級アルキルアミノカルボニルであってもよい)を表し、 $T$ は単結合、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-NR^K-$  (式中、 $R^K$ は前記 $R^A$ と同義である)、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^K-$  (式中、 $R^K$ は前記と同義である)、 $-NR^KC(=O)-$  (式中、 $R^K$ は前記と同義である)、 $-OCH_2-$ 、 $-CH_2O-$ 、 $-SCH_2-$ 、 $-SOCH_2-$ 、 $-SO_2CH_2-$ 、 $-CH_2S-$ 、 $-CH_2SO-$ 、 $-CH_2SO_2-$ 、 $-NR^KCR^L R^M-$  (式中、 $R^K$ は前記と同義であり、 $R^L$ および $R^M$ は同一または異なって、それぞれ前記 $R^A$ と同義である)、 $-NR^KSO_2-$  (式中、 $R^K$ は前記と同義である)、 $-SO_2NR^K-$  (式中、 $R^K$ は前記と同義である)、 $-CR^L R^M NR^K-$  (式中、 $R^K$ 、 $R^L$ および $R^M$ はそれぞれ前記と同義である)、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH=CH-$ 、 $-CH(OR^{KA})-$  (式中、 $R^{KA}$ は前記 $R^A$ と同義である)、 $-CH(OCOR^{KB})-$  (式中、 $R^{KB}$ は前記 $R^A$ と同義である)、または $-CH(NR^{KC}R^{KD})-$  (式中、 $R^{KC}$ および $R^{KD}$ は同一または異なって、それぞれ前記 $R^A$ と同義である)を表し、

Uは単結合、 $-(CH_2)_{m1} CR^M R^P-$ （式中、 $m1$ は0～2の整数を表し、 $R^M$ および $R^P$ は同一または異なって、それぞれ前記 $R^A$ と同義である）、または置換もしくは非置換のフェニレンを表し、

Vはカルボキシ、テトラゾール-5-イル、 $-CONH_2$ 、 $-CONHSO_2R^Q$ （式中、 $R^Q$ は前記 $R^A$ と同義である）、 $-SO_2R^Q$ （式中、 $R^Q$ は前記と同義である）、 $-SO_2NHR^Q$ （式中、 $R^Q$ は前記と同義である）、 $-SO_2NHCOR^Q$ （式中、 $R^Q$ は前記と同義である）、 $-SO_2NHCONR^R R^B$ （式中、 $R^R$ および $R^B$ は同一または異なって、それぞれ前記 $R^A$ と同義である）、 $-NHSO_2R^Q$ （式中、 $R^Q$ は前記と同義である）、 $-P(O)(OR^C)(OR^D)$ （式中、 $R^C$ および $R^D$ は同一または異なって、それぞれ前記 $R^A$ と同義である）、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニル、シアノ、またはニトロを表す]

で表される化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理的に許容される塩を有効成分として含有する好中球性炎症疾患の予防および/または治療剤。

### 13. Qが下式



[式中、 $R^S$ 、 $R^T$ 、 $R^U$ および $R^V$ は同一または異なって水素、置換もしくは非置



換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアロイル、置換もしくは非置換の複素環基、置換もしくは非置換の複素環アルキル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、低級アルコキシ、またはモノもしくはジ低級アルキルアミノを表し、

A<sup>5</sup>およびA<sup>6</sup>はそれぞれ前記と同義であり、

B<sup>3</sup>、B<sup>4</sup>およびB<sup>5</sup>は同一または異なって-O-または-S-を表し、

B<sup>6</sup>は-CR<sup>R</sup>-（式中、R<sup>R</sup>は前記と同義である）または-N-を表し、

環Eはベンゼン環、または窒素、酸素および硫黄から任意に選ばれる元素を1個以上有する芳香族複素環を表す]

で表される請求の範囲第12項記載の好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤。

14. 好中球性炎症疾患が、関節炎、敗血症および急性呼吸窮迫症候群(ARDS)から選ばれる好中球性炎症疾患である請求の範囲第1項記載の好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤。

15. 配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質の有効量を投与することを特徴とする、好中球性炎症疾患の予防および／または治療方法。

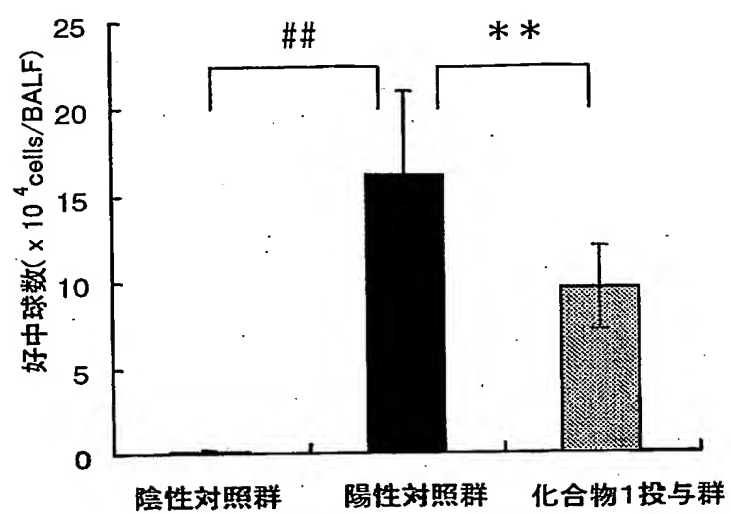
16. 請求の範囲第3項に記載の1)～4)のいずれか一つのオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体の有効量を投与することを特徴とする、好中球性炎症疾患の予防および／または治療方法。

17. 請求の範囲第4項に記載の1)～4)のいずれか一つの抗体の有効量を投与することを特徴とする、好中球性炎症疾患の予防および／または治療方法。

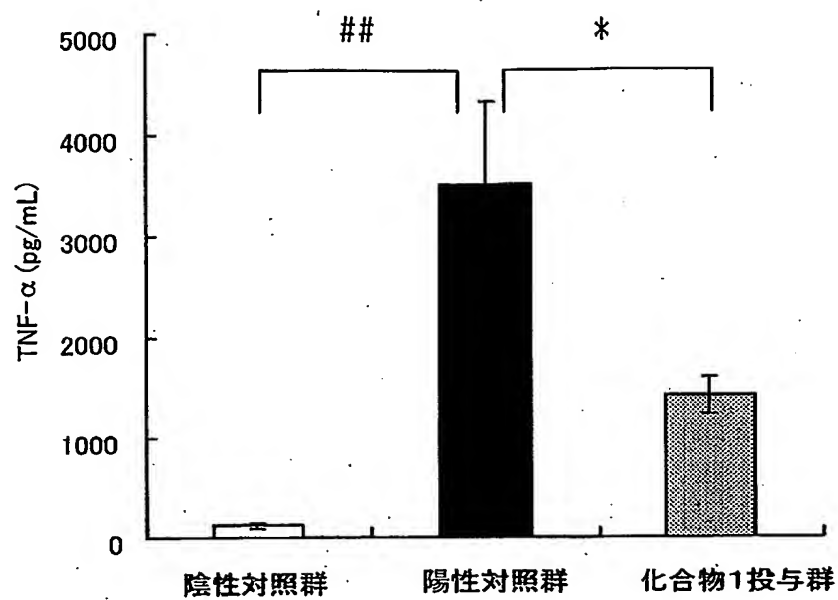
18. 好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤の製造のための、配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質の使用。

19. 好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤の製造のための、請求の範囲第 3 項に記載の 1) ～ 4) のいずれか一つのオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体の使用。

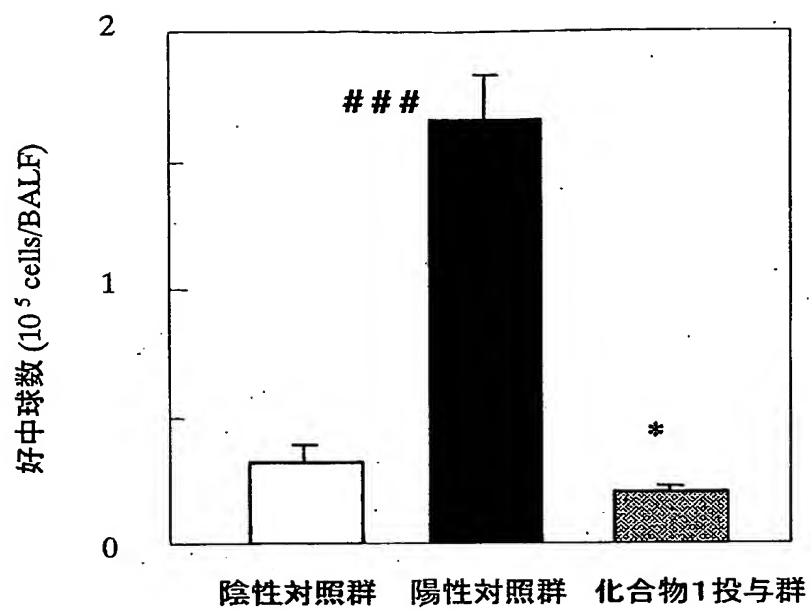
20. 好中球性炎症疾患の予防および／または治療剤の製造のための、請求の範囲第 4 項に記載の 1) ～ 4) のいずれか一つの抗体の使用。



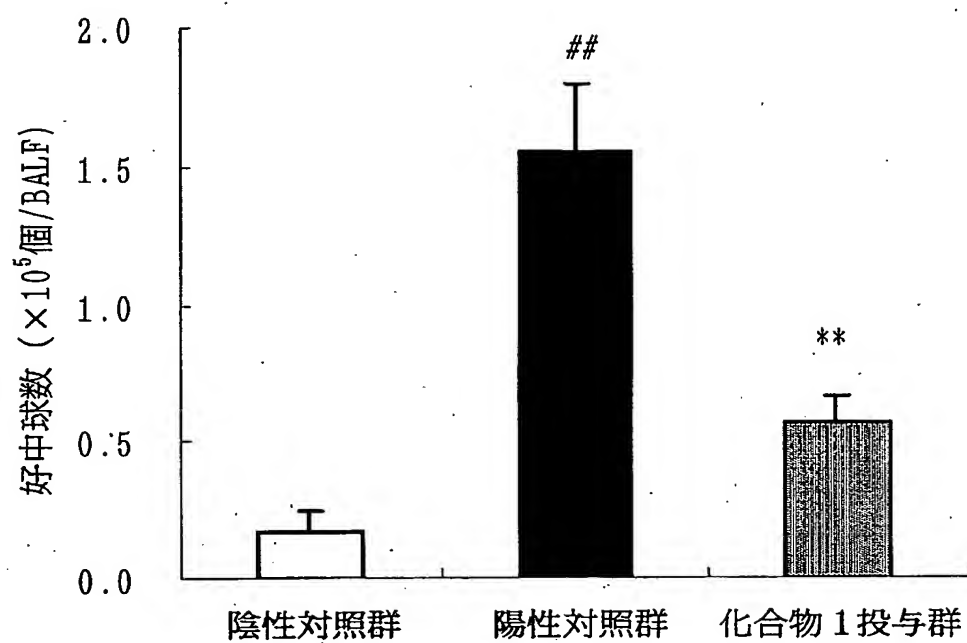
第1図



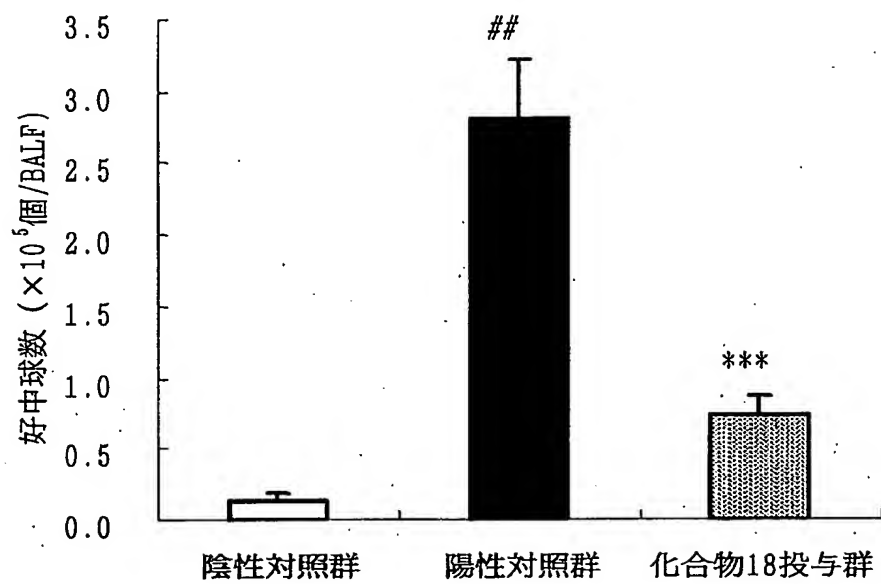
第 2 図



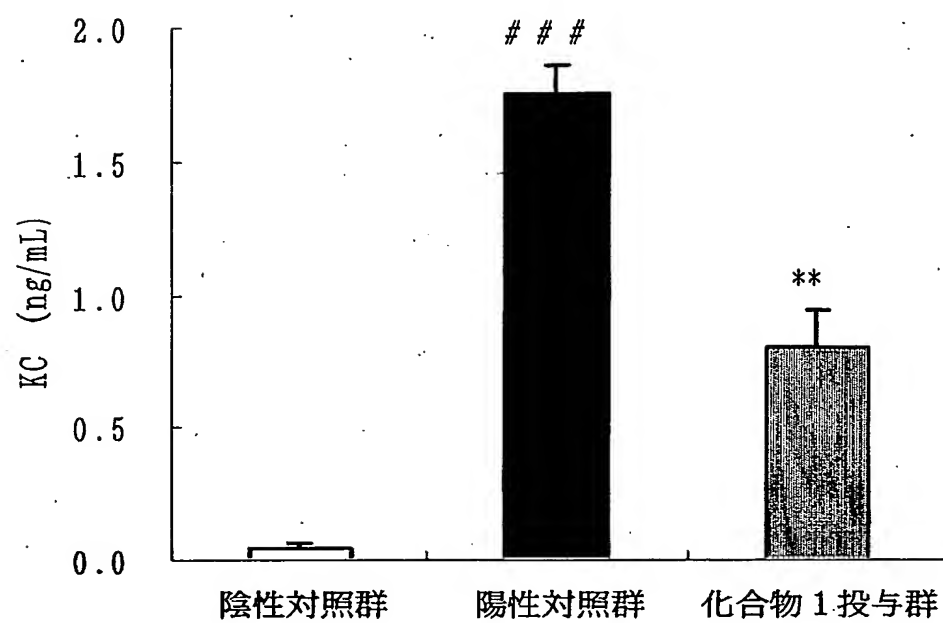
第3図



第4図

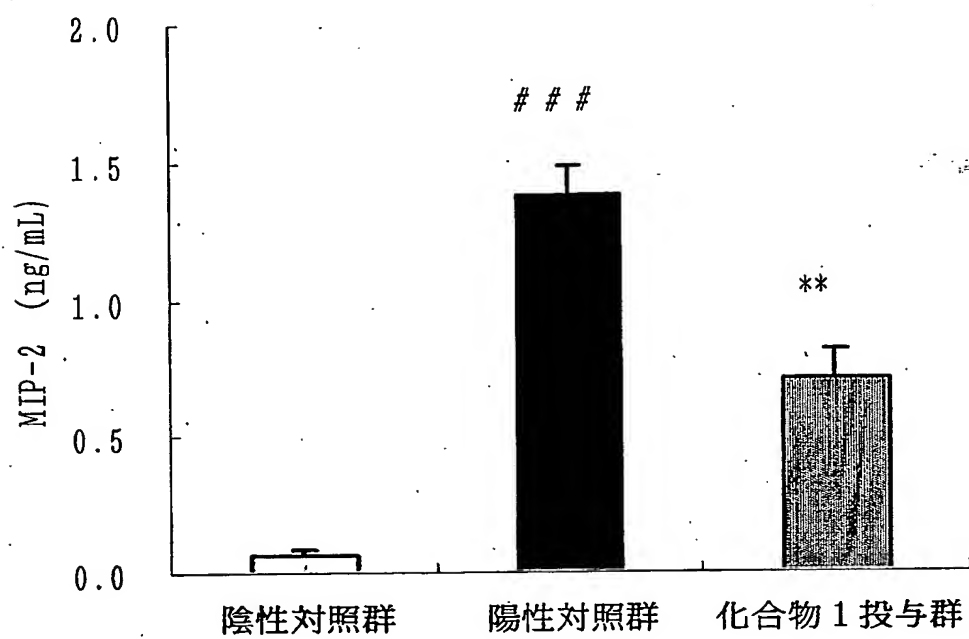


第5図

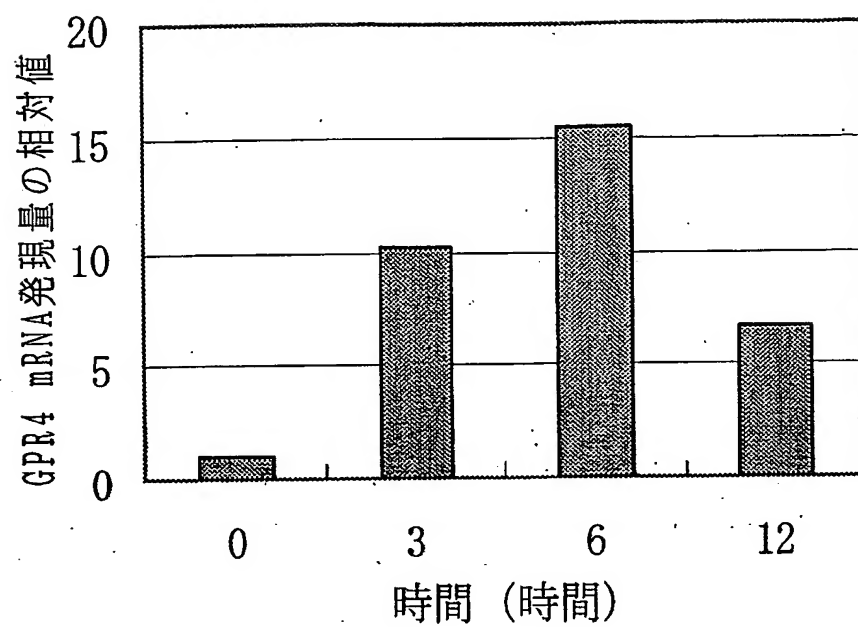


第 6 図

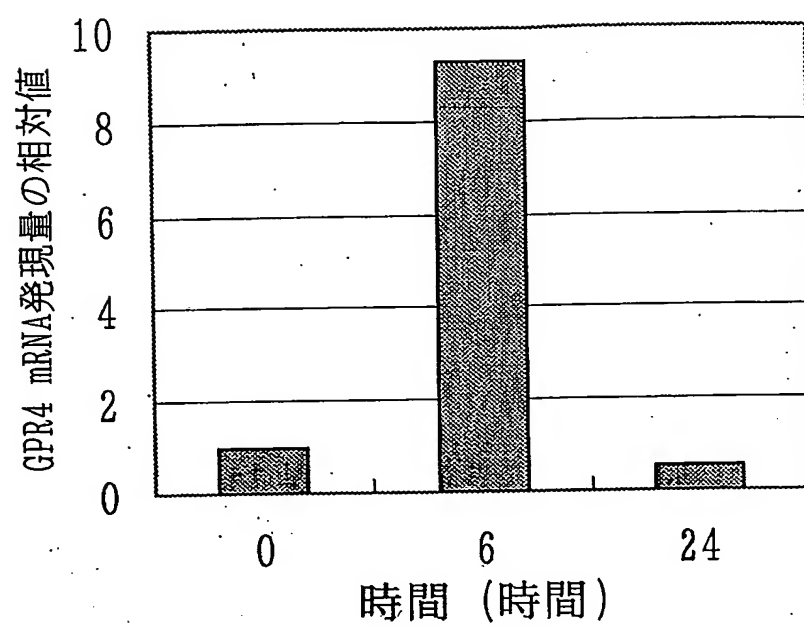




第7図



第8図



第9図

## SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> An agent for preventing and / or treating an inflammation disease related to neutrophil

<130> 11563W01

<140>

<141>

<150> JP 2003/118432

<151> 2003-04-23

<150> JP 2004/052191

<151> 2004-02-26

<160> 27

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 1

tcgacaaaata aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaa

54

<210> 2

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 2

tgcatgaaa aaaatgcttt atttgtgaaa ttgtgatgc tattgcttta ttg 54

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 3

tgcatctag ttgtggtttg tccaaactcg agccccggg 39

<210> 4

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 4

gtacccccgg gctcgagttt ggacaaacca caactagaa 39

<210> 5

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 5

tcgacgggat cgattcgact gacgtcatatc ttgacgtcac

40

<210> 6

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 6

tcgagtgacg tcaagtatga cgtcagtcga atcgataccg

40

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 7

gccccagaag cttaagtgcc caccatggg

29

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 8

gttcattgtg gcggccgcag catcttcagc tgc

33

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 9

cggagactct agagggtata taatg

25

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 10

ctaatacgac tcactatagg g

21

<210> 11

&lt;211&gt; 362

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 11

Met Gly Asn His Thr Trp Glu Gly Cys His Val Asp Ser Arg Val Asp

1 5 10 15

His Leu Phe Pro Pro Ser Leu Tyr Ile Phe Val Ile Gly Val Gly Leu

20 25 30

Pro Thr Asn Cys Leu Ala Leu Trp Ala Ala Tyr Arg Gln Val Gln Gln

35 40 45

Arg Asn Glu Leu Gly Val Tyr Leu Met Asn Leu Ser Ile Ala Asp Leu

50 55 60

Leu Tyr Ile Cys Thr Leu Pro Leu Trp Val Asp Tyr Phe Leu His His

65 70 75 80

Asp Asn Trp Ile His Gly Pro Gly Ser Cys Lys Leu Phe Gly Phe Ile

85 90 95

Phe Tyr Thr Asn Ile Tyr Ile Ser Ile Ala Phe Leu Cys Cys Ile Ser

100 105 110

Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Ala His Pro Leu Arg Phe Ala Arg Leu

115 120 125

Arg Arg Val Lys Thr Ala Val Ala Val Ser Ser Val Val Trp Ala Thr

130 135 140

Glu Leu Gly Ala Asn Ser Ala Pro Leu Phe His Asp Glu Leu Phe Arg

145 150 155 160

Asp Arg Tyr Asn His Thr Phe Cys Phe Glu Lys Phe Pro Met Glu Gly



165                      170                      175  
 Trp Val Ala Trp Met Asn Leu Tyr Arg Val Phe Val Gly Phe Leu Phe  
                          180                      185                      190  
 Pro Trp Ala Leu Met Leu Leu Ser Tyr Arg Gly Ile Leu Arg Ala Val  
                          195                      200                      205  
 Arg Gly Ser Val Ser Thr Glu Arg Gln Glu Lys Ala Lys Ile Lys Arg  
                          210                      215                      220  
 Leu Ala Leu Ser Leu Ile Ala Ile Val Leu Val Cys Phe Ala Pro Tyr  
                          225                      230                      235                      240  
 His Val Leu Leu Leu Ser Arg Ser Ala Ile Tyr Leu Gly Arg Pro Trp  
                          245                      250                      255  
 Asp Cys Gly Phe Glu Glu Arg Val Phe Ser Ala Tyr His Ser Ser Leu  
                          260                      265                      270  
 Ala Phe Thr Ser Leu Asn Cys Val Ala Asp Pro Ile Leu Tyr Cys Leu  
                          275                      280                      285  
 Val Asn Glu Gly Ala Arg Ser Asp Val Ala Lys Ala Leu His Asn Leu  
                          290                      295                      300  
 Leu Arg Phe Leu Ala Ser Asp Lys Pro Gln Glu Met Ala Asn Ala Ser  
                          305                      310                      315                      320  
 Leu Thr Leu Glu Thr Pro Leu Thr Ser Lys Arg Asn Ser Thr Ala Lys  
                          325                      330                      335  
 Ala Met Thr Gly Ser Trp Ala Ala Thr Pro Pro Ser Gln Gly Asp Gln  
                          340                      345                      350  
 Val Gln Leu Lys Met Leu Pro Pro Ala Gln

355

360

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 2932

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 12

ctgcagtcag ggggtgaact gacttcattc caatccctca gccccacca ggaccagtct 60  
 ggagtccttc cctgcccc attgaaattt cccttcctgc cccaaactta cctctgatct 120  
 agaccttact cacctccttc ctgtttccta agactccttc ctgccgtcca cagaccgagc 180  
 cttttatctt tgtccaccct gtgccagaca cctccttttc cagaaccttc tccttactgg 240  
 tgaccttact tatctctgtt gctttctggg gtccctaggaa atgccagcac tcccaccac 300  
 attgcctgaa ctttccaaca ctccctagct gcgctgtgtc ctatctcaac acttcctcat 360  
 gtatttcttg tgtcttctag aacattcccc cgccattatt acttcaatat ggctacacat 420  
 acttctaat tgccctgcaa accatctcct tctcaccatt gcccagcgt gctttcgtct 480  
 cctccataaa cactcccgga gaccaatttt tgtgtcacc ccatactccc tcgttgacac 540  
 actgactcca tacataacct ccttgaaaaa cctctttatt aatctcacca tcctccagac 600  
 ttccctcctg tcataattcc atccctcttc caacttttcc ctctcaagct ctgcccttcc 660  
 cagcccgacc cagcctacct aacctcatct ctccctgta gaccacatcc caccatgttc 720  
 ccctgagcct ccaaggaagg ggctcagggg gcccctggc ctcccgctcc ctgtggcccc 780  
 acagcccccg tgggccaggg gaagcgcccc agaagccgaa gtgcccacc atg ggc aac 838

Met Gly Asn

1

cac acg tgg gag ggc tgc cac gtg gac tcg cgc gtg gac cac ctc ttt 886  
 His Thr Trp Glu Gly Cys His Val Asp Ser Arg Val Asp His Leu Phe

5

10

15

ccg cca tcc ctc tac atc ttt gtc atc ggc gtg ggg ctg ccc acc aac 934  
 Pro Pro Ser Leu Tyr Ile Phe Val Ile Gly Val Gly Leu Pro Thr Asn

20

25

30

35

tgc ctg gct ctg tgg gcg gcc tac cgc cag gtg caa cag cgc aac gag 982  
 Cys Leu Ala Leu Trp Ala Ala Tyr Arg Gln Val Gln Gln Arg Asn Glu

|   |     |     |      |
|---|-----|-----|------|
| 40  | 45  | 50  |      |
| ctg ggc gtc tac ctg atg aac ctc agc atc gcc gac ctg ctg tac atc |     |     | 1030 |
| Leu Gly Val Tyr Leu Met Asn Leu Ser Ile Ala Asp Leu Leu Tyr Ile |     |     |      |
| 55  | 60  | 65  |      |
| tgc acg ctg ccg ctg tgg gtg gac tac ttc ctg cac cac gac aac tgg |     |     | 1078 |
| Cys Thr Leu Pro Leu Trp Val Asp Tyr Phe Leu His His Asp Asn Trp |     |     |      |
| 70  | 75  | 80  |      |
| atc cac ggc ccc ggg tcc tgc aag ctc ttt ggg ttc atc ttc tac acc |     |     | 1126 |
| Ile His Gly Pro Gly Ser Cys Lys Leu Phe Gly Phe Ile Phe Tyr Thr |     |     |      |
| 85  | 90  | 95  |      |
| aat atc tac atc agc atc gcc ttc ctg tgc tgc atc tcg gtg gac cgc |     |     | 1174 |
| Asn Ile Tyr Ile Ser Ile Ala Phe Leu Cys Cys Ile Ser Val Asp Arg |     |     |      |
| 100   | 105 | 110 | 115  |
| tac ctg gct gtg gcc cac cca ctc cgc ttc gcc cgc ctg cgc cgc gtc |     |     | 1222 |
| Tyr Leu Ala Val Ala His Pro Leu Arg Phe Ala Arg Leu Arg Arg Val |     |     |      |
| 120   | 125 | 130 |      |
| aag acc gcc gtg gcc gtg agc tcc gtg gtc tgg gcc acg gag ctg gcc |     |     | 1270 |
| Lys Thr Ala Val Ala Val Ser Ser Val Val Trp Ala Thr Glu Leu Gly |     |     |      |
| 135   | 140 | 145 |      |
| gcc aac tcg gcg ccc ctg ttc cat gac gag ctc ttc cga gac cgc tac |     |     | 1318 |
| Ala Asn Ser Ala Pro Leu Phe His Asp Glu Leu Phe Arg Asp Arg Tyr |     |     |      |
| 150   | 155 | 160 |      |
| aac cac acc ttc tgc ttt gag aag ttc ccc atg gaa gcc tgg gtg gcc |     |     | 1366 |
| Asn His Thr Phe Cys Phe Glu Lys Phe Pro Met Glu Gly Trp Val Ala |     |     |      |
| 165   | 170 | 175 |      |
| tgg atg aac ctc tat cgg gtg ttc gtg gcc ttc ctc ttc ccg tgg gcg |     |     | 1414 |
| Trp Met Asn Leu Tyr Arg Val Phe Val Gly Phe Leu Phe Pro Trp Ala |     |     |      |

|   |     |     |     |      |
|---|-----|-----|-----|------|
| 180   | 185 | 190 | 195 |      |
| ctc atg ctg ctg tcg tac cgg ggc atc ctg cgg gcc gtg cgg ggc agc |     |     |     | 1462 |
| Leu Met Leu Leu Ser Tyr Arg Gly Ile Leu Arg Ala Val Arg Gly Ser |     |     |     |      |
|   | 200 | 205 | 210 |      |
| gtg tcc acc gag cgc cag gag aag gcc aag atc aag cgg ctg gcc ctc |     |     |     | 1510 |
| Val Ser Thr Glu Arg Gln Glu Lys Ala Lys Ile Lys Arg Leu Ala Leu |     |     |     |      |
|   | 215 | 220 | 225 |      |
| agc ctc atc gcc atc gtg ctg gtc tgc ttt gcg ccc tat cac gtg ctc |     |     |     | 1558 |
| Ser Leu Ile Ala Ile Val Leu Val Cys Phe Ala Pro Tyr His Val Leu |     |     |     |      |
|   | 230 | 235 | 240 |      |
| ttg ctg tcc cgc agc gcc atc tac ctg ggc cgc ccc tgg gac tgc ggc |     |     |     | 1606 |
| Leu Leu Ser Arg Ser Ala Ile Tyr Leu Gly Arg Pro Trp Asp Cys Gly |     |     |     |      |
|   | 245 | 250 | 255 |      |
| ttc gag gag cgc gtc ttt tct gca tac cac agc tca ctg gct ttc acc |     |     |     | 1654 |
| Phe Glu Glu Arg Val Phe Ser Ala Tyr His Ser Ser Leu Ala Phe Thr |     |     |     |      |
|   | 260 | 265 | 270 | 275  |
| agc ctc aac tgt gtg gcg gac ccc atc ctc tac tgc ctg gtc aac gag |     |     |     | 1702 |
| Ser Leu Asn Cys Val Ala Asp Pro Ile Leu Tyr Cys Leu Val Asn Glu |     |     |     |      |
|   | 280 | 285 | 290 |      |
| ggc gcc cgc agc gat gtg gcc aag gcc ctg cac aac ctg ctc cgc ttt |     |     |     | 1750 |
| Gly Ala Arg Ser Asp Val Ala Lys Ala Leu His Asn Leu Leu Arg Phe |     |     |     |      |
|   | 295 | 300 | 305 |      |
| ctg gcc agc gac aag ccc cag gag atg gcc aat gcc tcg ctc acc ctg |     |     |     | 1798 |
| Leu Ala Ser Asp Lys Pro Gln Glu Met Ala Asn Ala Ser Leu Thr Leu |     |     |     |      |
|   | 310 | 315 | 320 |      |
| gag acc cca ctc acc tcc aag agg aac agc aca gcc.aaa gcc atg act |     |     |     | 1846 |
| Glu Thr Pro Leu Thr Ser Lys Arg Asn Ser Thr Ala Lys Ala Met Thr |     |     |     |      |

325                      330                      335  
 ggc agc tgg gcg gcc act ccg ccc tcc cag ggg gac cag gtg cag ctg 1894  
 Gly Ser Trp Ala Ala Thr Pro Pro Ser Gln Gly Asp Gln Val Gln Leu  
 340                      345                      350                      355  
 aag atg ctg ccg cca gca caa tga accccgagtg gcacagaatc cccagttttc 1948  
 Lys Met Leu Pro Pro Ala Gln  
 360  
 ccctctcacc ccacagtcct ttctctcctg gtctgggtga tgcaaattgt atggaaaaag 2008  
 ggctgtgtta atattcataa gaatacaaga acttaggaag agtgaggttg gtgtgtcact 2068  
 ggtcaacctt tgtgtcctca gatcccatea cagtttggcg attgtggagg gcctcctgaa 2128  
 ggaggagatg agtaaatata tttttttgga gacagggtct cactgtgttg cccaggctgg 2188  
 agtgcagtag tgcagtcgtg gctcactgca gcctccacct cctgggctct ccagcgatct 2248  
 tcccacatca gcctcccgag tagctgggac cacaaatgtg agcccacca tgcctggcta 2308  
 atttttgtac tttttgtata aatggagtct cactatgttt cccaggttg atcttgaact 2368  
 cctgggctca agagatcctc ctgccttggc ctcccaaagt gctcagatta gagatgtgag 2428  
 ccgccatgtc tggccagata aattaagtca aacatttggg ttccagaaaa taaagacaaa 2488  
 tagagaaggt tagatttttt tttttccaac aagtggataa aagtctgtga ctggggggaa 2548  
 agtgaagga gaaatgcagc cgatatagag tcattatgtt tgcaaagccc ctggtcatac 2608  
 aggccaggga acataagacc gcaattctaa gtttctagat aaacagcgat ctccaagtca 2668  
 agactgagga tgaagaggga gaatgtcaga actcaagtga agggcaatca gggcagactg 2728  
 cctggaggag tgatgccaga aggtttggga agaagggttg ggacaagaag aaagggtatt 2788  
 tattcattca ttcaacagag gtttatgtag ggcactgtgc tgggtggggc tggggacaca 2848  
 acaatgactg aggcagcctg gccttgctt cacagggtc accatacaca agtaaataaa 2908  
 aaatatgtaa tgtttggaat tgct 2932

<210> 13

<211> 365

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Met Asp Asn Ser Thr Gly Thr Gly Glu Gly Cys His Val Asp Ser Arg

1                    5                    10                    15  
 Val Asp His Leu Phe Pro Pro Ser Leu Tyr Ile Phe Val Ile Gly Val  
                   20                    25                    30  
 Gly Leu Pro Thr Asn Cys Leu Ala Leu Trp Ala Ala Tyr Arg Gln Val  
                   35                    40                    45  
 Arg Gln His Asn Glu Leu Gly Val Tyr Leu Met Asn Leu Ser Ile Ala  
                   50                    55                    60  
 Asp Leu Leu Tyr Ile Cys Thr Leu Pro Leu Trp Val Asp Tyr Phe Leu  
                   65                    70                    75                    80  
 His His Asp Asn Trp Ile His Gly Pro Gly Ser Cys Lys Leu Phe Gly  
                   85                    90                    95  
 Phe Ile Phe Tyr Ser Asn Ile Tyr Ile Ser Ile Ala Phe Leu Cys Cys  
                   100                    105                    110  
 Ile Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Ala His Pro Leu Arg Phe Ala  
                   115                    120                    125  
 Arg Leu Arg Arg Val Lys Thr Ala Val Ala Val Ser Ser Val Val Trp  
                   130                    135                    140  
 Ala Thr Glu Leu Gly Ala Asn Ser Ala Pro Leu Phe His Asp Glu Leu  
                   145                    150                    155                    160  
 Phe Arg Asp Arg Tyr Asn His Thr Phe Cys Phe Glu Lys Phe Pro Met  
                   165                    170                    175  
 Glu Arg Trp Val Ala Trp Met Asn Leu Tyr Arg Val Phe Val Gly Phe  
                   180                    185                    190  
 Leu Phe Pro Trp Ala Leu Met Leu Leu Cys Tyr Arg Gly Ile Leu Arg

|   |     |         |
|---|-----|---------|
| 195   | 200 | 205     |
| Ala Val Gln Ser Ser Val Ser Thr Glu Arg Gln Glu Lys Val Lys Ile |     |         |
| 210   | 215 | 220     |
| Lys Arg Leu Ala Leu Ser Leu Ile Ala Ile Val Leu Val Cys Phe Ala |     |         |
| 225   | 230 | 235 240 |
| Pro Tyr His Ala Leu Leu Leu Ser Arg Ser Ala Val Tyr Leu Gly Arg |     |         |
| 245   | 250 | 255     |
| Pro Trp Asp Cys Gly Phe Glu Glu Arg Val Phe Ser Ala Tyr His Ser |     |         |
| 260   | 265 | 270     |
| Ser Leu Ala Phe Thr Ser Leu Asn Cys Val Ala Asp Pro Ile Leu Tyr |     |         |
| 275   | 280 | 285     |
| Cys Leu Val Asn Glu Gly Ala Arg Ser Asp Val Ala Lys Ala Leu His |     |         |
| 290   | 295 | 300     |
| Asn Leu Leu Arg Phe Leu Ala Ser Asn Lys Pro Gln Glu Met Ala Asn |     |         |
| 305   | 310 | 315 320 |
| Ala Ser Leu Thr Leu Glu Thr Pro Leu Thr Ser Lys Arg Ser Thr Thr |     |         |
| 325   | 330 | 335     |
| Gly Lys Ser Ser Gly Ala Val Trp Ala Val Pro Pro Thr Ala Gln Gly |     |         |
| 340   | 345 | 350     |
| Asp Gln Val Pro Leu Lys Val Leu Leu Pro Pro Ala Gln             |     |         |
| 355   | 360 | 365     |

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 1098

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 14

```

atg gac aac agc acg ggc aca ggg gag ggc tgc cat gtg gac tct cga 48
Met Asp Asn Ser Thr Gly Thr Gly Glu Gly Cys His Val Asp Ser Arg
1           5           10          15

gtg gac cac ctc ttc cca cca tct ctc tac atc ttc gtc atc ggg gtg 96
Val Asp His Leu Phe Pro Pro Ser Leu Tyr Ile Phe Val Ile Gly Val
20          25          30

ggg ctg ccc acc aac tgc ctg gcc ctg tgg gca gcc tac cgg cag gtg 144
Gly Leu Pro Thr Asn Cys Leu Ala Leu Trp Ala Ala Tyr Arg Gln Val
35          40          45

cgc caa cac aat gag ctg ggc gtc tac ctg atg aac ttg agc att gca 192
Arg Gln His Asn Glu Leu Gly Val Tyr Leu Met Asn Leu Ser Ile Ala
50          55          60

gac ctg ctg tac atc tgc act ttg ccg ctg tgg gtc gac tac ttc ctc 240
Asp Leu Leu Tyr Ile Cys Thr Leu Pro Leu Trp Val Asp Tyr Phe Leu
65          70          75          80

cac cat gac aac tgg atc cac ggc cct ggc tcc tgc aag ctc ttt ggc 288
His His Asp Asn Trp Ile His Gly Pro Gly Ser Cys Lys Leu Phe Gly
85          90          95

ttc atc ttc tac agc aac atc tat atc agc atc gcc ttc ctg tgc tgc 336
Phe Ile Phe Tyr Ser Asn Ile Tyr Ile Ser Ile Ala Phe Leu Cys Cys
100         105         110

atc tcc gtg gac cgc tac ctg gct gtg gct cat cct ctg cgc ttt gca 384
Ile Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Ala His Pro Leu Arg Phe Ala
115         120         125

cgc ctg cgc cgg gtc aag aca gca gtg gct gtg agc tct gtg gtc tgg 432

```



Arg Leu Arg Arg Val Lys Thr Ala Val Ala Val Ser Ser Val Val Trp  
 130 135 140

gcc acg gag ctg ggc gcc aat tca gca ccg ctc ttc cat gat gag ctg 480  
 Ala Thr Glu Leu Gly Ala Asn Ser Ala Pro Leu Phe His Asp Glu Leu  
 145 150 155 160

ttt cgt gat cgc tac aac cac acc ttc tgc ttt gag aag ttc ccc atg 528  
 Phe Arg Asp Arg Tyr Asn His Thr Phe Cys Phe Glu Lys Phe Pro Met  
 165 170 175

gag cgt tgg gtg gcc tgg atg aat ctg tac cgc gtc ttt gtg ggc ttc 576  
 Glu Arg Trp Val Ala Trp Met Asn Leu Tyr Arg Val Phe Val Gly Phe  
 180 185 190

ctc ttc ccc tgg gca ctc atg ttg ctg tgc tac cgt ggc atc ctg agg 624  
 Leu Phe Pro Trp Ala Leu Met Leu Leu Cys Tyr Arg Gly Ile Leu Arg  
 195 200 205

gca gtg cag agc agt gtg tcc acc gag cgc cag gag aaa gtc aag atc 672  
 Ala Val Gln Ser Ser Val Ser Thr Glu Arg Gln Glu Lys Val Lys Ile  
 210 215 220

aaa cgt ctg gcc ctg agc ctc atc gcc att gtg ctg gtg tgc ttt gcg 720  
 Lys Arg Leu Ala Leu Ser Leu Ile Ala Ile Val Leu Val Cys Phe Ala  
 225 230 235 240

cct tac cat gct ctc ctg ctg tct cgc agc gcc gtc tac ctg ggc cgg 768  
 Pro Tyr His Ala Leu Leu Leu Ser Arg Ser Ala Val Tyr Leu Gly Arg  
 245 250 255

ccc tgg gac tgt ggc ttc gag gag cga gtc ttt tct gcc tac cac agc 816  
 Pro Trp Asp Cys Gly Phe Glu Glu Arg Val Phe Ser Ala Tyr His Ser  
 260 265 270

tcc ctg gcc ttc acc agc ctc aat tgt gtg gct gac ccc atc ctc tac 864

Ser Leu Ala Phe Thr Ser Leu Asn Cys Val Ala Asp Pro Ile Leu Tyr  
 275 280 285

tgc ctg gtc aac gag ggt gcc cgc agt gat gtg gcc aag gcc ctg cac 912  
 Cys Leu Val Asn Glu Gly Ala Arg Ser Asp Val Ala Lys Ala Leu His  
 290 295 300

aac ctc ctc cgc ttc ctg gcc agc aac aag ccc cag gag atg gcc aat 960  
 Asn Leu Leu Arg Phe Leu Ala Ser Asn Lys Pro Gln Glu Met Ala Asn  
 305 310 315 320

gct tcc ctc acc ctg gag aca ccc ttg acc tcc aag agg agc acc acc 1008  
 Ala Ser Leu Thr Leu Glu Thr Pro Leu Thr Ser Lys Arg Ser Thr Thr  
 325 330 335

ggc aag tcg tcc ggg gct gtc tgg gca gtg cct ccg act gcc cag ggg 1056  
 Gly Lys Ser Ser Gly Ala Val Trp Ala Val Pro Pro Thr Ala Gln Gly  
 340 345 350

gac cag gtg cca ctg aag gtg ctg ctg ccc ccg gca cag tga 1098  
 Asp Gln Val Pro Leu Lys Val Leu Leu Pro Pro Ala Gln  
 355 360 365

<210> 15

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 15

ataagcttgccaccatggacaacagcacgggcac

36

<210> 16

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

&lt;400&gt; 16

tagcggccgctcactgtgccgggggcagcag

33

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 365

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 17

Met Asp Asn Ser Thr Gly Thr Trp Glu Gly Cys His Val Asp Ser Arg

1

5

10

15

Val Asp His Leu Phe Pro Pro Ser Leu Tyr Ile Phe Val Ile Gly Val

20

25

30

Gly Leu Pro Thr Asn Cys Leu Ala Leu Trp Ala Ala Tyr Arg Gln Val

35

40

45

Arg Gln Arg Asn Glu Leu Gly Val Tyr Leu Met Asn Leu Ser Ile Ala

50

55

60

Asp Leu Leu Tyr Ile Cys Thr Leu Pro Leu Trp Val Asp Tyr Phe Leu

65

70

75

80

His His Asp Asn Trp Ile His Gly Pro Gly Ser Cys Lys Leu Phe Gly

85

90

95

Phe Ile Phe Tyr Ser Asn Ile Tyr Ile Ser Ile Ala Phe Leu Cys Cys

100

105

110

Ile Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Ala His Pro Leu Arg Phe Ala  
115 120 125

Arg Leu Arg Arg Val Lys Thr Ala Val Ala Val Ser Ser Val Val Trp  
130 135 140

Ala Thr Glu Leu Gly Ala Asn Ser Ala Pro Leu Phe His Asp Glu Leu  
145 150 155 160

Phe Arg Asp Arg Tyr Asn His Thr Phe Cys Phe Glu Lys Phe Pro Met  
165 170 175

Glu Arg Trp Val Ala Trp Met Asn Leu Tyr Arg Val Phe Val Gly Phe  
180 185 190

Leu Phe Pro Trp Ala Leu Met Leu Leu Cys Tyr Arg Gly Ile Leu Arg  
195 200 205

Ala Val Gln Ser Ser Val Ser Thr Glu Arg Gln Glu Lys Val Lys Ile  
210 215 220

Lys Arg Leu Ala Leu Ser Leu Ile Ala Ile Val Leu Val Cys Phe Ala  
225 230 235 240

Pro Tyr His Ala Leu Leu Leu Ser Arg Ser Ala Val Tyr Leu Gly Arg  
245 250 255

Pro Trp Asp Cys Gly Phe Glu Glu Arg Val Phe Ser Ala Tyr His Ser  
260 265 270

Ser Leu Ala Phe Thr Ser Leu Asn Cys Val Ala Asp Pro Ile Leu Tyr  
275 280 285

Cys Leu Val Asn Glu Gly Ala Arg Ser Asp Val Ala Lys Ala Leu His  
290 295 300

Asn Leu Leu Arg Phe Leu Ala Ser Asn Lys Pro Gln Glu Met Ala Asn  
 305 310 315 320

Ala Ser Leu Thr Leu Glu Thr Pro Leu Thr Ser Lys Arg Ser Thr Thr  
 325 330 335

Gly Lys Thr Ser Gly Ala Val Trp Ala Val Pro Pro Thr Ala Gln Gly  
 340 345 350

Asp Gln Val Pro Leu Lys Val Leu Leu Pro Pro Ala Gln  
 355 360 365

<210> 18

<211> 1098

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 18

atg gac aac agc acg ggc acg tgg gag ggc tgc cat gtg gac tct cga 48  
 Met Asp Asn Ser Thr Gly Thr Trp Glu Gly Cys His Val Asp Ser Arg  
 1 5 10 15

gtg gac cac ctc ttc cca cca tcc ctc tac atc ttc gtc atc ggg gtg 96  
 Val Asp His Leu Phe Pro Pro Ser Leu Tyr Ile Phe Val Ile Gly Val  
 20 25 30

ggg ctg ccc acc aac tgc ctg gcc ctg tgg gca gcc tac cgc cag gtg 144  
 Gly Leu Pro Thr Asn Cys Leu Ala Leu Trp Ala Ala Tyr Arg Gln Val  
 35 40 45

cgc cag cgc aat gag ctg ggc gtc tac ctg atg aac ttg agc atc gca 192  
 Arg Gln Arg Asn Glu Leu Gly Val Tyr Leu Met Asn Leu Ser Ile Ala  
 50 55 60



gcc gta cag agc agt gtg tcc acc gag cgc cag gag aaa gtc aag atc 672  
 Ala Val Gln Ser Ser Val Ser Thr Glu Arg Gln Glu Lys Val Lys Ile  
 210 215 220

aaa cgc ctg gcc ctg agc ctc atc gcc atc gtg ctg gtg tgc ttt gca 720  
 Lys Arg Leu Ala Leu Ser Leu Ile Ala Ile Val Leu Val Cys Phe Ala  
 225 230 235 240

ccc tac cat gct ctc ttg ctg tct cgc agc gct gtc tat ctg ggc cgg 768  
 Pro Tyr His Ala Leu Leu Leu Ser Arg Ser Ala Val Tyr Leu Gly Arg  
 245 250 255

ccc tgg gac tgt ggc ttc gag gag cga gtc ttc tct gcc tac cac agc 816  
 Pro Trp Asp Cys Gly Phe Glu Glu Arg Val Phe Ser Ala Tyr His Ser  
 260 265 270

tcc cta gcc ttc acc agc ctc aat tgc gtg gct gac ccc atc ctc tac 864  
 Ser Leu Ala Phe Thr Ser Leu Asn Cys Val Ala Asp Pro Ile Leu Tyr  
 275 280 285

tgc ctg gtc aac gag ggt gcc cgt agt gac gtg gcc aaa gcc ctg cac 912  
 Cys Leu Val Asn Glu Gly Ala Arg Ser Asp Val Ala Lys Ala Leu His  
 290 295 300

aac ctc ctc cgc ttc ctg gcc agc aac aag ccc cag gag atg gcc aat 960  
 Asn Leu Leu Arg Phe Leu Ala Ser Asn Lys Pro Gln Glu Met Ala Asn  
 305 310 315 320

gct tcc ctc acc ctg gag aca cca ttg acc tcc aag agg agc acc acc 1008  
 Ala Ser Leu Thr Leu Glu Thr Pro Leu Thr Ser Lys Arg Ser Thr Thr  
 325 330 335

ggc aaa acg tct ggg gct gtc tgg gca gtg cct ccc act gcc cag ggg 1056  
 Gly Lys Thr Ser Gly Ala Val Trp Ala Val Pro Pro Thr Ala Gln Gly  
 340 345 350

gac cag gtg cca ctg aag gtg ctg ctg ccc ccg gca cag tga 1098  
Asp Gln Val Pro Leu Lys Val Leu Leu Pro Pro Ala Gln  
355 360 365

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 19

ctcttcccctgggcactcatgttg

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 20

gaatctgtaccgcgtctttgtg

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 21

tcaggatgccacggtagca

<210> 22

<211> 30



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 22

cctggagaaacctgcccaagtatgatgacat

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 23

atgtgtccgtcgtggatctga

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 24

atgcctgcttcaccaccttct

<210> 25

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 25

cccatcaccatcttccaggagc

<210> 26

<211> 74

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 26

gaa tct gta ccg cgt ctt tgt ggg ctt cct ctt ccc ctg ggc act cat 48

gtt gct gtg cta ccg tgg cat cct ga 74

<210> 27

<211> 580

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 27

ccc atc acc atc ttc cag gag cga gac ccc act aac atc aaa tgg ggt 48

gag gcc ggt gct gag tat gtc gtg gag tct act ggt gtc ttc acc acc 96

atg gag aag gcc ggg gcc cac ttg aag ggt gga gcc aaa cgg gtc atc 144

atc tcc gcc cct tct gcc gat gcc ccc atg ttt gtg atg ggt gtg aac 192

cac gag aaa tat gac aac tca ctc aag att gtc agc aat gca tcc tgc 240

acc acc aac tgc tta gcc ccc ctg gcc aag gtc atc cat gac aac ttt 288

ggc att gtg gaa ggg ctc atg acc aca gtc cat gcc atc act gcc acc 336

cag aag act gtg gat ggc ccc tct gga aag ctg tgg cgt gat ggc cgt 384

ggg gct gcc cag aac atc atc cct gca tcc act ggt gct gcc aag gct 432

gtg ggc aag gtc atc cca gag ctg aac ggg aag ctc act ggc atg gcc 480

ttc cgt gtt cct acc ccc aat gtg tcc gtc gtg gat ctg acg tgc cgc 528

ctg gag aaa cct gcc aag tat gat gac atc aag aag gtg gtg aag cag 576

gca t 580